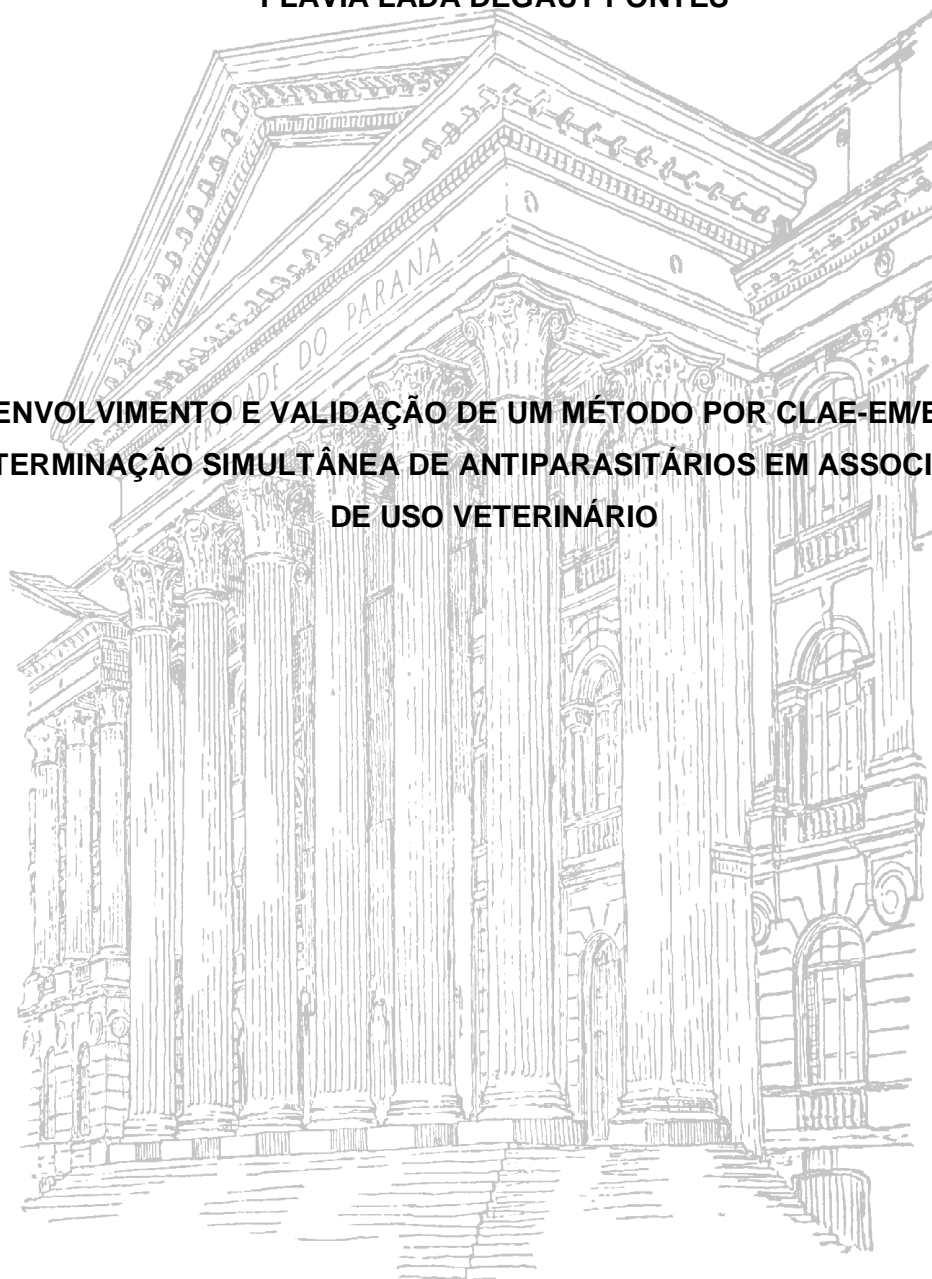


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLÁVIA LADA DEGAUT PONTES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO POR CLAE-EM/EM PARA
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANTIPARASITÁRIOS EM ASSOCIAÇÕES
DE USO VETERINÁRIO**



CURITIBA

2011

FLÁVIA LADA DEGAUT PONTES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO POR CLAE-EM/EM PARA
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANTIPARASITÁRIOS EM ASSOCIAÇÕES
DE USO VETERINÁRIO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Insumos, Medicamentos e Correlatos, Linha de Pesquisa Produção e Qualidade, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Angela Cristina Leal Badaró Trindade

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

CURITIBA

2011

Pontes, Flávia Lada Degaut

Desenvolvimento e validação de um método por CLAE-EM/EM para determinação simultânea de antiparasitários em associações de uso veterinário / Flávia Lada Degaut Pontes – Curitiba, 2011.

150 f.: il. (algumas color.); 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Angela Cristina Leal Badaró Trindade

Coorientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2011.

Inclui bibliografia

1. Ivermectina. 2. Febantel. 3. Praziquantel. 4. Pamoato de pirantel.
5. CLAE-EM/EM. I. Trindade, Angela Cristina Leal Badaró. II. Pontarolo, Roberto. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.1

TERMO DE APROVAÇÃO

FLÁVIA LADA DEGAUT PONTES

Título: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO POR CLAE-EM/EM PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANTIPARASITÁRIOS EM ASSOCIAÇÕES DE USO VETERINÁRIO

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.

Angela C. B. Trindade

Profª. Drª. Angela Cristina Leal Badaró Trindade
Orientadora

Roberto Pontarolo

Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Co-orientador

Francinete Ramos Campos

Profª. Drª. Francinete Ramos Campos
Universidade Federal do Paraná

Juliano Smanioto Barin

Prof. Dr. Juliano Smanioto Barin
Universidade Federal de Santa Maria

Curitiba, 19 de dezembro de 2011.

*Com todo amor aos meus avós,
Eugênio Lada (in memoriam) e Salomeia Guiz Lada,
que me ensinaram as coisas simples, porém fundamentais da vida.*

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas colaboraram para que esse trabalho pudesse ser concluído e, neste momento, as palavras chegam a ser poucas para expressar a minha eterna gratidão ...

À Deus,

por iluminar a minha vida, me dando fé, coragem, paciência e perseverança ao longo dessa caminhada.

Aos meus pais, Maristela Lada de Oliveira e Marcelo Carvalho Degaut Pontes, e aos pais de coração, Luciane Degaut Pontes e Laerte de Oliveira,

pelo verdadeiro sentido de família partilhado, pelo amor, carinho, dedicação e paciência. Sem o seu incentivo não seria possível investir longas horas de trabalho, privando-os da merecida atenção.

Aos meus irmãos, João Vitor Degaut Pontes e Maria Eduarda Degaut Pontes,

por tornar a minha vida mais completa e feliz!

À minha orientadora Prof. Dra. Angela Cristina Leal Badaró Trindade,

pela disponibilidade com que aceitou me orientar, pelos ensinamentos, amizade, confiança, compreensão, paciência e incentivo. Minha sincera gratidão, respeito e admiração.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Roberto Pontarolo,

que me acolheu em seu laboratório e ao longo desses dois anos estive ao meu lado nas horas mais difíceis, resolvendo problemas e propondo soluções. Agradeço pela oportunidade de aprendizado, amizade, respeito, confiança e incentivo na realização deste trabalho. Meu respeito e enorme gratidão.

À Prof. Dra. Francinete Ramos Campos,

sempre pronta a ajudar e sugerir mudanças para melhor. Agradeço pelos ensinamentos no universo da Espectrometria de Massas e, principalmente, pelo carinho, amizade, apoio e atenção.

À Prof. Dra. Marilis Dallarmi Miguel,
pela amizade, incentivo e, em especial, por ter despertado a minha paixão pela docência durante o período de estágio em sua disciplina.

Ao Prof. Dr. Itamar Andreazza,
que com sua experiência me orientou quanto a elaboração dos placebos.

Aos estimados professores Dr. Aguinaldo Nascimento e Dra. Kazuko Hishida,
que me acompanham desde o período da graduação, e cujos preciosos ensinamentos profissionais e para a vida não serão esquecidos.

Ao Daniel Altino de Jesus do LACEN-PR,
pela gentil concessão das substâncias químicas de referência de ivermectina, eprinomectina e albendazol.

Ao grande amigo e incentivador João Cleverson Gasparetto,
pela grande disponibilidade, ao deixar seus afazeres, para contribuir com sua experiência no aprimoramento deste trabalho. Meu carinho, amizade, respeito, admiração e enorme gratidão.

Ao querido amigo Dr. Marco André Cardoso,
que me apoiou e muito me ajudou no início do desenvolvimento deste trabalho com seus conhecimentos sobre cromatografia. Meu sincero carinho e admiração.

Aos meus avós, Eugênio Lada (in memoriam), Salomeia Guiz Lada, Ubyrathan Teixeira Degaut Pontes e Solange Godoy,
pelo carinho e amor incondicional que dedicaram a mim ao longo dos anos. Amo vocês.

Ao meu saudoso bisavô Aldbert Carvalho (in memoriam),
pelo amor e que, mesmo ausente, tenho a certeza de que desejou o meu êxito. A saudade é imensa.

À todos os meus familiares, em especial ao tios, Álvaro Lada, Arnaldo Lada, Maricélia Lada, Dirce Regina Lobo dos Santos, Márcia Carvalho Degaut Pontes e Marli Lada,
pelos conselhos, amor e momentos maravilhosos e inesquecíveis que guardo com carinho desde à infância.

Ao amado primo Gabriel Lada Andretti,
que durante o seu período de estágio, foi sempre prestativo e solícito no preparo de amostras e na infatigável lavagem das vidrarias.

À meus eternos amigos, Nicole Glock Maceno, Marcelo Campese, Fernanda Fabíola Salamanca, Pamella Graciela Elias, Rafaella Ezidório, Ana Paula Studzinski, Nereide Silva, Tereza Luxi
e tantos outros que a vida me deu, com os quais cresci, aprendi e convivi tantos anos e hoje sou um pouco de cada um, com suas qualidades e defeitos.

À Consuelo Reis Pereira, Sirlei Sayomi Hayashi, Letícia Cerqueira Bonâncio, Caroline Paola Uber, Thais Martins Guimarães de Francisco, Andreia Cristina Conegero Sanches, Bianca Sarturi Hess, Caroline Carvalho Alves, Helena Hiemisch Lobo Borba, Letícia Paula Leonart, Luana Lenzi, Astrid Wiens, Ana Carolina Melchior, Mário Sérgio Piantavini, Cleverson Antônio Ferreira Martins, Rafael Venson, Jocy Cristo, Felipe Casarin dos Santos e César Fernando Kavalkevski,
queridos amigos do Laboratório de Controle de Qualidade e Centro de Estudos em Biofarmácia, pelas conversas, almoços, momentos de diversão, companheirismo, respeito e agradável convívio.

Aos adoráveis amigos, Augusto César Rebouças, Amanda Martinez Slomp, Caroline Grisbach, Cibelle de Borba Dallagassa, Dayse Fernanda de Souza, Gisele Floriani, Íris Hammerschmidt, Karin Goebel, Patrícia Pavan, Suélen Wolf
e a todos os outros colegas de pós-graduação pelo carinho, amizade e companheirismo ao longo desses dois anos.

Ao querido amigo Aparecido Guedes Ferreira,
pelo apoio e incentivo quando da minha decisão em tentar fazer o mestrado.

Ao grupo de jovens MAIS, em especial, ao Padre Benedito de Assis e ao Heitor Lipinski,
que ao longo dos encontros se revelaram grandes amigos e com “ânimo e coragem” me ensinaram a buscar a Deus.

À Capes, pela bolsa de estudo concedida.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!

"Quando nada parece dar certo, vou ver o cortador de pedras martelando sua rocha talvez cem vezes, sem que uma única rachadura apareça. Mas na centésima primeira martelada a pedra se abre em duas, e eu sei que não foi aquela que conseguiu isso, mas todas as que vieram antes."

Jacob August Riis

RESUMO

Helmintíases são doenças parasitárias comumente encontradas nos animais e de importância para a saúde pública, uma vez que podem ser transmitidas aos seres humanos. Para o tratamento das helmintíases, combinações de um ou mais fármacos com diferentes mecanismos de ação são necessários para aumentar o espectro de ação bem como a eficácia no controle da infecção. Entre os principais antiparasitários, a ivermectina, o febantel, o praziquantel e o pamoato de pirantel são os mais utilizados. Combinações de dose fixa contendo esses fármacos são amplamente disponíveis no mercado, e o controle de qualidade desses medicamentos se torna importante, especialmente porque a administração de altas doses de ivermectina pode ser tóxica para os animais. Para atender a essa necessidade, nenhum método foi descrito para a quantificação simultânea da ivermectina, febantel, praziquantel e pamoato de pirantel em comprimidos. O presente trabalho trata do desenvolvimento e validação de um método por CLAE-EM/EM para determinação simultânea destas substâncias em comprimidos. As análises foram conduzidas em um cromatógrafo acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo, operando com interface *electrospray* no modo positivo de ionização. As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna C8 (50 x 2,1 mm; 5 μ m) acoplada a uma pré-coluna C8 (10 x 2,1 mm; 5 μ m), ambas mantidas a 20°C. A fase móvel foi eluída no modo isocrático a 200 μ L.min⁻¹ e consistiu em mistura 10:90 v/v de água e acetonitrila/água (95:5 v/v), ambas contendo 0,1% de ácido fórmico e 3 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio. O volume de injeção foi de 20 μ L. As amostras foram preparadas por pulverização dos comprimidos e a extração dos analitos foi obtida através de sonicação com acetonitrila/metanol (50:50 v/v). As soluções das amostras foram diluídas em fase móvel e o febantel, praziquantel e pamoato de pirantel foram diretamente analisados por CLAE-EM/EM. A ivermectina foi extraída da mistura de fármacos por extração em fase sólida utilizando cartuchos Oasis HLB. A eluição foi feita com 1 mL de acetonitrila e o eluato foi concentrado em um concentrador de amostras (40°C) antes da injeção. O método validado apresentou excelentes coeficientes de correlação ($r \geq 0,99$) para todas as curvas de calibração ao longo do intervalo de 40 a 200 ng.mL⁻¹ para ivermectina, 20 a 100 ng.mL⁻¹ para o febantel e pamoato de pirantel e 6 a 30 ng.mL⁻¹ para o praziquantel. O intervalo de recuperação para o ensaio de exatidão foi de 93,26 a 101,36% com um DPR < 5% para a precisão intradia e interdia. O estudo da robustez indicou que variações na concentração de aditivos, proporção da fase móvel, temperatura e fluxo são críticas. Análises das amostras comerciais demonstraram uma falta de padronização nas quantidades desses antiparasitários, principalmente da ivermectina. O presente método é uma alternativa para o controle de qualidade de preparações farmacêuticas contendo ivermectina, febantel, praziquantel e pamoato de pirantel.

Palavras-chave: Ivermectina. Febantel. Praziquantel. Pamoato de pirantel. CLAE-EM/EM. Espectrometria de massas

ABSTRACT

Helminthiasis are parasitic diseases commonly found in animals and it has public health importance since it can be transmissible to humans. For the treatment of helminthiasis, combinations of more than one drug with different mechanisms of action are required to increase the spectrum of action as well as the effectiveness in the infection control. Among the main antiparasitics, ivermectin, febantel, praziquantel and pyrantel pamoate are the most commonly used. Fixed dose combinations containing these drugs are widely available in the market, and the quality control of these medicines becomes important, especially because the administration of high levels of ivermectin can be toxic for the animals. To meet this requirement, there is no reported method for simultaneous quantification of ivermectin, febantel, praziquantel and pyrantel pamoate in tablets. The present work was devoted to the development and validation of a HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of these substances in tablets. Analyses were conducted on a chromatograph coupled to a triple quadrupole mass spectrometer operating in *electrospray* positive ion mode. Chromatographic separations were achieved on a C8 column (50 x 2.1 mm i.d; 5 μ m particle size) coupled with a C8 (10 x 2.1 mm i.d; 5 μ m particle size) guard column maintained at 20 °C. The isocratic mobile phase eluted at 200 μ L.min⁻¹ consisted of 10:90 v/v of water and acetonitrile/water solution (95:5 v/v), both containing 0.1% formic acid and 3 mmol.L⁻¹ of ammonium formate. The injection volume was 20 μ L. Samples were prepared by powdering of the tablets and the analytes extraction was achieved with acetonitrile:methanol (50:50 v/v) by sonication. Sample solutions were diluted with mobile phase and febantel, praziquantel and pyrantel pamoate were directly analyzed by HPLC-MS/MS. Ivermectin was extracted from drugs mixture by solid-phase extraction using Oasis HLB cartridges. Elution was done with 1 mL acetonitrile and the eluate was concentrated in a sample concentrator (40 °C) before injection. The validated method showed excellent coefficients of correlation ($r \geq 0.99$) for all of the calibration curves over the ranges of 40 to 200 ng.mL⁻¹ for ivermectin, 20 to 100 ng.mL⁻¹ for febantel and pyrantel pamoate and 6 to 30 ng.mL⁻¹ for praziquantel. The range of recovery was 93.26 to 101.36% with a RSD < 5% for intraday and interday precision. The robustness study indicated that variations in the additives concentration, mobile phase proportion, flow and temperature are critical. Analyses of commercial samples demonstrated a lack of standardization in the amounts of these antiparasitics, mainly of ivermectin. The present method is an alternative for the quality control of pharmaceutical preparations containing ivermectin, febantel, praziquantel and pyrantel pamoate.

Key words: Ivermectin. Febantel. Praziquantel. Pyrantel pamoate. LC-MS/MS. Mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	FÓRMULA ESTRUTURAL DA IVERMECTINA (B1a E B1b)	29
FIGURA 2 -	FÓRMULAS ESTRUTURAIS DO FEBANTEL E RESPECTIVAS IMPUREZAS	30
FIGURA 3 -	FÓRMULAS ESTRUTURAIS DO PRAZIQUANTEL E RESPECTIVAS IMPUREZAS	32
FIGURA 4 -	FÓRMULAS ESTRUTURAIS DO PAMOATO DE PIRANTEL E RESPECTIVAS IMPUREZAS	34
FIGURA 5 -	ESQUEMA DE UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS EQUIPADO COM FONTE DE IONIZAÇÃO <i>ELECTROSPRAY</i> , ANALISADOR TRIPLO QUADRUPOLO E DETECTOR MULTIPLICADOR DE ELÉTRONS	54
FIGURA 6 -	ESQUEMA DE IONIZAÇÃO POR <i>ELECTROSPRAY</i>	55
FIGURA 7 -	ESQUEMA DE IONIZAÇÃO POR APCI	56
FIGURA 8 -	ESQUEMA DE UM QUADRUPOLO	57
FIGURA 9 -	FÓRMULAS ESTRUTURAIS DOS PADRÕES INTERNOS ALBENDAZOL E EPRINOMECTINA (B1a)	69
FIGURA 10 -	ESPECTRO DE VARREDURA (200 A 500 <i>m/z</i>) DA MISTURA DE ANALITOS	96
FIGURA 11 -	ESPECTRO DE VARREDURA (850 A 950 <i>m/z</i>) DA MISTURA DE ANALITOS	96
FIGURA 12 -	ÍONS FRAGMENTO DA IVERMECTINA ($[M+NH_4]^+$ <i>m/z</i> 892,3) OBTIDOS ATRAVÉS DE MRM	99
FIGURA 13 -	CROMATOGRAMA DOS FÁRMACOS, IMPUREZAS E PADRÕES INTERNOS OBTIDO ATRAVÉS DO USO DA COLUNA XBRIDGE C18 (100 x 2,1 mm, 5 μ m) E FASE MÓVEL 50:50 v/v DE ÁGUA E ACETONITRILA/ÁGUA (95:5 v/v), AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO E 3 mmol.L ⁻¹ DE FORMIATO DE AMÔNIO, ELUÍDA NO MODO ISOCRÁTICO	101

FIGURA 14 -	CROMATOGRAMA DOS FÁRMACOS, IMPUREZAS E PADRÕES INTERNOS OBTIDO ATRAVÉS DO USO DA COLUNA XBRIDGE C18 (100 x 2,1 mm, 5 µm) E FASE MÓVEL 10:90 v/v DE ÁGUA E ACETONITRILA/ÁGUA (95:5 v/v), AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO E 3 mmol.L ⁻¹ DE FORMIATO DE AMÔNIO, ELUÍDA NO MODO ISOCRÁTICO	101
FIGURA 15 -	CROMATOGRAMA DOS FÁRMACOS, IMPUREZAS E PADRÕES INTERNOS OBTIDO ATRAVÉS DO USO DA COLUNA XBRIDGE C18 (50 x 2,1 mm, 5 µm) E FASE MÓVEL 10:90 v/v DE ÁGUA E ACETONITRILA/ÁGUA (95:5 v/v), AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO E 3 mmol.L ⁻¹ DE FORMIATO DE AMÔNIO, ELUÍDA NO MODO ISOCRÁTICO	102
FIGURA 16 -	CROMATOGRAMA DOS FÁRMACOS, IMPUREZAS E PADRÕES INTERNOS OBTIDO ATRAVÉS DO USO DA COLUNA XBRIDGE C8 (50 x 2,1 mm, 5 µm) E FASE MÓVEL 50:50 v/v DE ÁGUA E ACETONITRILA/ÁGUA (95:5 v/v), AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO E 3 mmol.L ⁻¹ DE FORMIATO DE AMÔNIO, ELUÍDA NO MODO ISOCRÁTICO	103
FIGURA 17 -	CROMATOGRAMA DOS FÁRMACOS, IMPUREZAS E PADRÕES INTERNOS OBTIDO ATRAVÉS DO USO DA COLUNA XBRIDGE C8 (50 x 2,1 mm, 5 µm) E FASE MÓVEL (A) ÁGUA E (B) ACETONITRILA/ÁGUA (95:5 v/v), AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO E 3 mmol.L ⁻¹ DE FORMIATO DE AMÔNIO, ELUÍDA NO MODO GRADIENTE	103
FIGURA 18 -	CROMATOGRAMA DOS FÁRMACOS, IMPUREZAS E PADRÕES INTERNOS OBTIDO ATRAVÉS DO USO DA COLUNA XBRIDGE C8 (50 x 2,1 mm, 5 µm) E FASE MÓVEL 10:90 v/v DE ÁGUA E ACETONITRILA/ÁGUA (95:5 v/v), AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO E 3 mmol.L ⁻¹ DE FORMIATO DE AMÔNIO, ELUÍDA NO MODO ISOCRÁTICO	104
FIGURA 19 -	CROMATOGRAMAS DAS SOLUÇÕES DO BRANCO AO UTILIZAR A SOLUÇÃO DE LIMPEZA ÁGUA:METANOL 50:50 v/v (A) E ACETONITRILA:METANOL 50:50 v/v (B) NA LIMPEZA DA SERINGA DO INJETOR AUTOMÁTICO	105
FIGURA 20 -	CROMATOGRAMAS DOS PLACEBOS (A), (B), (C), (D), (E) E DA MISTURA DE PADRÕES ANALÍTICOS (F) NO ENSAIO DE SELETIVIDADE	106

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	INTENSIDADE DE SINAL DOS ANALITOS UTILIZANDO DIFERENTES COMBINAÇÕES DE ADITIVOS	94
GRÁFICO 2 -	COMPARAÇÃO DA INTENSIDADE DE SINAL DOS ANALITOS UTILIZANDO 3 mmol.L ⁻¹ DE FORMIATO DE AMÔNIO COMBINADO COM 1% E 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO	95
GRÁFICO 3 -	LINEARIDADE DO FEBANTEL OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM	110
GRÁFICO 4 -	LINEARIDADE DO PAMOATO DE PIRANTEL OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM	111
GRÁFICO 5 -	LINEARIDADE DO PRAZICUANTEL OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM	112
GRÁFICO 6 -	LINEARIDADE DA IVERMECTINA OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM	113
GRÁFICO 7 -	ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES ESTOQUE EM REFRIGERADOR (4°C)	130
GRÁFICO 8 -	ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES ESTOQUE A TEMPERATURA AMBIENTE	130
GRÁFICO 9 -	ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO DE TRABALHO NO GERENCIADOR DE AMOSTRAS (20°C)	132

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	DESCRIÇÃO DO REGISTRO, DATA DE FABRICAÇÃO E VALIDADE, COMPOSIÇÃO E TEOR DE ATIVO (S) DECLARADO NAS AMOSTRAS DE COMPRIMIDOS CONTENDO ANTIPARASITÁRIOS	68
QUADRO 2 -	PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS	90
QUADRO 3 -	PARÂMETROS OTIMIZADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA CADA FÁRMACO, IMPUREZA E PADRÃO INTERNO	91
QUADRO 4 -	PARÂMETROS OTIMIZADOS ATRAVÉS DO EXPERIMENTO DE MRM PARA OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS MAIS INTENSOS DE CADA ANALITO	98
QUADRO 5 -	PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO OTIMIZADOS ATRAVÉS DE ANÁLISES POR INJEÇÃO EM FLUXO	100

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO FÁRMACO IVERMECTINA	37
TABELA 2 -	MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO FÁRMACO FEBANTEL	42
TABELA 3 -	MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO FÁRMACO PRAZIQUANTEL	45
TABELA 4 -	MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO FÁRMACO PAMOATO DE PIRANTEL	49
TABELA 5 -	MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS À ASSOCIAÇÃO DOS FÁRMACOS	52
TABELA 6 -	CLASSIFICAÇÃO DOS TESTES SEGUNDO SUA FINALIDADE	59
TABELA 7 -	ENSAIOS NECESSÁRIOS PARA A VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO SEGUNDO SUA FINALIDADE	60
TABELA 8 -	LIMITES PORCENTUAIS DO TEOR DO ANALITO QUE DEVEM ESTAR CONTIDOS NO INTERVALO DE LINEARIDADE PARA ALGUNS MÉTODOS ANALITICOS.....	63
TABELA 9 -	FATORES QUE DEVEM SER CONSIDERADOS NA DETERMINAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO ANALÍTICO	67
TABELA 10 -	DESCRIÇÃO DO PESO MOLECULAR, TEOR E MARCA DAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO	69
TABELA 11 -	FAIXA DE SOLUBILIDADE DE UMA SUBSTÂNCIA EM UM DETERMINADO VOLUME DE SOLVENTE	72
TABELA 12 -	MISTURA DE SOLVENTES UTILIZADAS PARA O ESTUDO DE SOLUBILIDADE DA IVERMECTINA, FEBANTEL, PRAZIQUANTEL E PAMOATO DE PIRANTEL	72
TABELA 13 -	DIFERENTES PROPORÇÕES DE ADITIVOS UTILIZADOS PARA CHECAGEM DE SINAL DOS ANALITOS	74
TABELA 14 -	ESQUEMA DE DILUIÇÃO PARA O PREPARO DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS NO ENSAIO DE LINEARIDADE	79

TABELA 15 -	NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO UTILIZADOS PARA O ENSAIO DE PRECISÃO	80
TABELA 16 -	PARÂMETROS MODIFICADOS PARA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO	81
TABELA 17 -	SOLUBILIDADE DOS FÁRMACOS EM DIFERENTES SOLVENTES	92
TABELA 18 -	SOLUBILIDADE DOS FÁRMACOS EM DIFERENTES MISTURAS DE ACETONITRILA COM DIMETILSULFÓXIDO OU METANOL	93
TABELA 19 -	RESULTADO DOS LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ANALITOS EM CLAE-EM/EM.....	107
TABELA 20 -	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS NO ESTUDO DA LINEARIDADE	109
TABELA 21 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DE FEBANTEL	110
TABELA 22 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DE PAMOATO DE PIRANTEL	111
TABELA 23 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DE PRAZICUANTEL	112
TABELA 24 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DE IVERMECTINA	113
TABELA 25 -	VALORES DE DESVIO PADRÃO RELATIVO OBTIDOS ATRAVÉS DAS MÉDIAS DAS ÁREAS NO ENSAIO DE REPETIBILIDADE	114
TABELA 26 -	VALORES DE DESVIO PADRÃO RELATIVO OBTIDOS ATRAVÉS DAS MÉDIAS DAS ÁREAS NO ENSAIO DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA	115
TABELA 27 -	RESULTADOS DO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO OBTIDOS EM CLAE-EM/EM PELO MÉTODO DA ADIÇÃO DO PADRÃO	117
TABELA 28 -	RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ PARA O FEBANTEL	119
TABELA 29 -	RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ PARA O PAMOATO DE PIRANTEL	120

TABELA 30 -	RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ PARA O PRAZQUANTEL	121
TABELA 31 -	RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ PARA A IVERMECTINA	122
TABELA 32 -	RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ PARA O ALBENDAZOL	123
TABELA 33 -	RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ PARA A EPRINOMECTINA	124
TABELA 34 -	RESULTADO DO ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES ESTOQUE A 4°C E A TEMPERATURA AMBIENTE (22 A 25°C)	126
TABELA 35 -	RESULTADO DO ESTUDO DE ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO DE TRABALHO APÓS ARMAZENAMENTO NO GERENCIADOR DE AMOSTRAS (20°C)	131
TABELA 36 -	PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DA IVERMECTINA UTILIZANDO CARTUCHO OASIS HLB E DIFERENTES SOLVENTES DE LAVAGEM	135
TABELA 37 -	VALORES DE RECUPERAÇÃO DA IVERMECTINA OBTIDOS ATRAVÉS DE ANALISTAS E DIAS DIFERENTES..	136
TABELA 38 -	RESULTADO DA DETERMINAÇÃO DA IVERMECTINA NA AMOSTRA 1 (USO HUMANO)	137
TABELA 39 -	RESULTADO DA DETERMINAÇÃO DA IVERMECTINA, FEBANTEL, PRAZQUANTEL E PAMOATO DE PIRANTEL NA AMOSTRA 2	137
TABELA 40 -	RESULTADO DA DETERMINAÇÃO DA IVERMECTINA, FEBANTEL, PRAZQUANTEL E PAMOATO DE PIRANTEL NA AMOSTRA 3	137
TABELA 41 -	RESULTADO DA DETERMINAÇÃO DA IVERMECTINA, FEBANTEL, PRAZQUANTEL E PAMOATO DE PIRANTEL NA AMOSTRA 4	138

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANFALPET	- Associação Nacional dos Fabricantes de Produtos para Animais de Estimação
ANOVA	- Análise de variância
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	- <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
CAD	- <i>Collisionally activated dissociation</i>
CE	- <i>Collision energy</i>
CEP	- <i>Cell entrance potencial</i>
CFF	- Conselho Federal de Fármacia
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	- CLAE com detector de arranjo de diodos
CLAE-EM/EM	- CLAE acoplada ao espectrômetro de massas, com o recurso da espectrometria de massas sequencial
CLAE-UV	- CLAE com detector de ultravioleta
CLC	- Cromatografia Líquida Clássica
CLUE-EM/EM	- Cromatografia de Ultra Eficiência acoplada ao espectrômetro de massas, com o recurso da espectrometria de massas sequencial
cps	- Ciclos por segundo
CUR	- <i>Curtain gas</i>
CV	- Coeficiente de variação
CXP	- <i>Cell exit potencial</i>
DAD	- Detector de arranjo de diodos
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DP	- Desvio padrão
DP*	- <i>Declustering potencial</i>
DPR	- Desvio padrão relativo
DC	- Corrente elétrica
EFS	- Extração em fase sólida
EM/EM	- Espectrometria de massas sequencial
EP	- <i>Entrance potencial</i>
ESI	- <i>Electrospray</i>
FDA	- Food and Drug Administration
FIA	- Análise por injeção em fluxo

GABA	- Ácido gama-aminobutírico
GS1	- <i>Nebulizer gas</i>
GS2	- <i>Turbo gas</i>
ICH	- International Conference on Harmonisation
ICR	- <i>Ion cyclotron resonance</i>
INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial do Brasil
IS	- <i>Ion spray voltage</i>
IUPAC	- International Union of Pure and Applied Chemistry
LD	- Limite de detecção
LQ	- Limite de quantificação
<i>m/z</i>	- massa/carga
MI	- Multiple ions
MRM	- <i>Multiple Reaction Monitoring</i>
ms	- <i>Millisecond</i>
[M+H] ⁺	- Massa molecular mais um hidrogênio
[M+Na] ⁺	- Massa molecular mais um sódio
[M+NH ₄] ⁺	- Massa molecular mais um amônio
n	- Número de amostras
PVDF	- Fluoreto de polivinilideno
RE	- Resolução
rf	- Rádio frequência
rpm	- Rotações por minuto
TOF	- <i>Time of fly</i>
Tr	- Tempo de retenção
USP	- <i>The United States Pharmacopeial Convention</i>
UV	- Ultravioleta
V	- Volts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 OBJETIVO GERAL.....	23
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 MERCADO VETERINÁRIO.....	24
2.2 PARASIToses	24
2.2.1 Ancilostomose	25
2.2.2 Dirofilariose	25
2.2.3 Toxocaríase.....	25
2.2.4 Tricuriose.....	26
2.3 ZOONoses	26
2.3.1 Larva <i>migrans</i> cutânea.....	26
2.3.2 Larva <i>migrans</i> visceral.....	26
2.4 TERAPÊUTICA	27
2.4.1 Ivermectina.....	28
2.4.2 Febantel	29
2.4.3 Praziquantel	31
2.4.4 Pamoato de pirantel	33
2.4.5 Associação de fármacos	34
2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE IVERMECTINA, FEBANTEL, PRAZIQUANTEL E PAMOATO DE PIRANTEL.....	35
2.5.1 Métodos analíticos aplicados ao fármaco ivermectina	35
2.5.2 Métodos analíticos aplicados ao fármaco febantel.....	41
2.5.3 Métodos analíticos aplicados ao fármaco praziquantel	44
2.5.4 Métodos analíticos aplicados ao fármaco pamoato de pirantel.....	48
2.5.5 Métodos analíticos aplicados a associação dos fármacos	52
2.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	53
2.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS	54
2.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	58
2.8.1 Especificidade/Seletividade.....	60
2.8.2 Limite de Detecção.....	61
2.8.3 Limite de Quantificação.....	62
2.8.4 Linearidade.....	62
2.8.5 Intervalo.....	63
2.8.6 Precisão	64
2.8.6.1 Repetitividade.....	64
2.8.6.2 Precisão Intermediária.....	65
2.8.6.3 Reprodutibilidade.....	65
2.8.7 Exatidão	65
2.8.8 Robustez	67

3 MATERIAL E MÉTODOS	68
3.1 MATERIAL	68
3.1.1 Amostras comerciais de associação de antiparasitários de uso veterinário.....	68
3.1.2 Substâncias químicas de referência.....	69
3.1.3 Excipientes, reagentes e solventes	70
3.1.4 Equipamentos e consumíveis.....	70
3.2 ESTUDO DA SOLUBILIDADE DOS FÁRMACOS.....	71
3.3 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM/EM.....	73
3.3.1 Preparo da fase móvel	73
3.3.2 Preparo das soluções estoque	73
3.3.3 Preparo das soluções diluentes	73
3.3.4 Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas.....	74
3.3.5 Otimização da cromatografia.....	75
3.3.6 Teste de <i>carry over</i>	75
3.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM/EM.....	76
3.4.1 Seletividade.....	76
3.4.2 Limites de detecção e quantificação.....	78
3.4.3 Linearidade e intervalo	78
3.4.4 Precisão	79
3.4.5 Exatidão	80
3.4.6 Robustez	81
3.4.7 Teste de estabilidade	82
3.4.7.1 Teste de estabilidade das soluções estoque.....	82
3.4.7.2 Teste de estabilidade da solução de trabalho	82
3.5 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DA IVERMECTINA.....	83
3.5.1 Extração líquido-líquido.....	83
3.5.2 Extração em fase sólida	85
3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE ANTIPARASITÁRIOS PARA DETERMINAÇÃO VIA CLAE-EM/EM.....	87
3.6.1 Preparo dos comprimidos contendo associações dos antiparasitários	87
3.6.1.1 Preparo dos comprimidos para determinação do febantel, praziquantel e pamoato de pirantel.....	87
3.6.1.2 Preparo dos comprimidos para determinação da ivermectina.....	88
3.6.2 Preparo da amostra de uso humano contendo ivermectina	89
3.6.2.1 Preparo por diluição direta	89
3.6.2.2 Preparo por extração em fase sólida.....	89
3.7 PARÂMETROS DO MÉTODO CLAE-EM/EM PARA DETERMINAÇÃO DOS ANTIPARASITÁRIOS.....	90
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
4.1 ESTUDO DA SOLUBILIDADE DOS FÁRMACOS.....	92
4.2 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM/EM.....	93
4.2.1 Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas.....	93
4.2.1.1 Otimização da ionização dos analitos	93
4.2.1.2 Análise por Multiple Reaction Monitoring (MRM).....	97

4.2.1.3 Análise por injeção em fluxo (FIA).....	99
4.2.2 Otimização da cromatografia.....	100
4.2.3 Teste de carry over.....	105
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM/EM.....	106
4.3.1 Seletividade.....	106
4.3.2 Limite de detecção e limite de quantificação.....	107
4.3.3 Linearidade.....	108
4.3.4 Intervalo de trabalho.....	113
4.3.5 Precisão.....	114
4.3.5.1 Repetitividade.....	114
4.3.5.2 Precisão intermediária.....	115
4.3.6 Exatidão.....	116
4.3.7 Robustez.....	118
4.3.8 Teste de estabilidade.....	125
4.3.8.1 Estabilidade das soluções estoque.....	125
4.3.8.2 Estabilidade da solução de trabalho.....	131
4.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DA IVERMECTINA.....	132
4.4.1 Extração líquido-líquido.....	133
4.4.2 Extração em fase sólida.....	134
4.5 DETERMINAÇÃO VIA CLAE-EM/EM DOS ANTIPARASITÁRIOS NAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE COMPRIMIDOS.....	136
5 CONCLUSÃO.....	139
REFERÊNCIAS.....	141

1 INTRODUÇÃO

Os animais de companhia, especialmente cães e gatos, desempenham um importante papel na sociedade, contribuindo para o desenvolvimento físico, social e emocional das crianças e do bem-estar de seus proprietários, em especial os idosos (ROBERTSON *et al.*, 2000). Esses animais, por sua vez, necessitam de cuidados básicos, como alimentação, abrigo e higiene. No entanto, apesar desses cuidados, são suscetíveis a enfermidades, como as parasitoses. Dentre as principais destacam-se a ancilostomose, dirofilariose, toxocaríase e tricurirose (FOREYT, 2005).

Embora esses animais ofereçam significativos benefícios também representam risco à saúde dos seres humanos pela ocorrência de zoonoses, doenças de animais transmissíveis ao homem. Uma vez que as zoonoses são, frequentemente, uma consequência da postura humana, um fator importante no controle zoonótico é o de quebrar o ciclo de transmissão, sendo que a educação desempenha um papel chave nesse quesito, através da conscientização dos proprietários quanto a medidas básicas de higiene após contato com o animal e a vermifugação preventiva e regular desses animais (ROBERTSON *et al.*, 2000; HEUKELBACH; FELDMEIER, 2008).

A vermifugação contribui tanto para o controle das parasitoses desses animais quanto para a redução do risco das zoonoses. Para isso, existem diferentes antiparasitários disponíveis no mercado, sendo que grande parte associa mais de um anti-helmíntico na forma farmacêutica. Uma associação frequentemente utilizada para esta prática é a dos antiparasitários ivermectina, febantel, praziquantel e pamoato de pirantel.

Apesar da comercialização dessa associação, não foi encontrado na literatura nenhum método de análise simultânea desses fármacos associados em comprimidos, sendo este o fator determinante na escolha do tema. Concomitante, observa-se uma contínua mudança na legislação da indústria farmacêutica veterinária, aumentando as exigências em relação à fabricação de produtos.

Desta forma, este trabalho visou a obtenção de um método de quantificação para determinação simultânea de ivermectina, febantel, praziquantel e pamoato de pirantel em comprimidos, utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

acoplada ao Espectrômetro de Massas, com o recurso da Espectrometria de Massas Sequencial (CLAE-EM/EM). Este método poderá ser empregado para avaliação das associações destes antiparasitários encontradas no mercado brasileiro, contribuindo para a melhoria da qualidade dos produtos veterinários no Brasil, bem como para a inserção do farmacêutico no controle de qualidade desses medicamentos.

1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método por CLAE-EM/EM para quantificação simultânea dos fármacos ivermectina, febantel, praziquantel e pamoato de pirantel associados em comprimidos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Otimizar os parâmetros cromatográficos e do espectrômetro de massas;

Validar o método de CLAE-EM/EM, atendendo as normas vigentes pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e normas internacionais, como a *International Conference on Harmonisation (ICH)*;

Quantificar pelo método desenvolvido por CLAE-EM/EM, os fármacos ivermectina, febantel, pamoato de pirantel e praziquantel associados em comprimidos de diferentes amostras disponíveis no mercado nacional.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MERCADO VETERINÁRIO

Nos últimos anos tem-se observado um contínuo crescimento do comércio de produtos direcionados a animais de pequeno porte, como cães e gatos. Estes que antigamente eram considerados apenas companheiros, tornaram-se hoje “membros da família”, o que agrega mais cuidados e preocupação com o bem estar desses animais.

No Brasil, segundo dados obtidos pela Associação Nacional dos Fabricantes de Produtos para Animais de Estimação (ANFALPET), estimou-se para o ano de 2010, uma população de cerca de 33 milhões de cães e 17 milhões de gatos, conduzindo as empresas do mercado veterinário a investirem grandes quantias em melhorias dos produtos e propagandas (ANFALPET, 2010).

O faturamento desse mercado no ano de 2009, segundo a ANFALPET, foi de R\$ 9.692.102.539,00. Dentro desse mercado, também chamado de mercado pet, o setor relacionado à saúde é um dos que mais cresce, sendo que R\$ 696.389.571,00 referem-se apenas a medicamentos, ou seja, 7% do faturamento total (ANFALPET, 2010).

2.2 PARASITOSE

Dentre os medicamentos mais prescritos e comercializados estão os antiparasitários, que são empregados no tratamento de diversas parasitoses que acometem a saúde de cães e gatos, como a ancilostomose, a dirofilariose, a toxocaríase e a tricurirose.

2.2.1 Ancilostomose

Os nematódeos *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma braziliense* e *Ancylostoma tubaeforme* estão entre os helmintos mais prevalentes nos cães e gatos, e podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de uma série de distúrbios, como anemia e diarreia, e ainda pelo aumento da morte de animais jovens. A infecção ocorre tanto pela ingestão das larvas quanto pela amamentação, em que as fêmeas transmitem as larvas para os filhotes através do leite (EPE, 2009).

2.2.2 Dirofilariose

A *Dirofilaria immitis*, originária da Ásia, é um dos principais parasitas que acomete a saúde dos cães e a transmissão ocorre através de mosquitos do gênero *Anopheles*, *Culex* e *Aedes* (BOWMAN; ATKINS, 2009; MONTROYA-ALONSO *et al.*, 2010).

A dirofilariose cardiopulmonar é uma doença causada por esse parasita e afeta principalmente os pulmões e coração, tendo como principais sinais clínicos a perda de peso, letargia, tosse, distensão abdominal e, em alguns casos, morte (BOWMAN; ATKINS, 2009).

2.2.3 Toxocaríase

A toxocaríase canina é provocada pela ingestão de ovos de parasitas do gênero *Toxocara*, que caem na corrente sanguínea e eclodem nos pulmões, formando as larvas. Essas larvas, por sua vez, migram para a traquéia, passam pela laringe e completam o ciclo no intestino, aonde habitam e as fêmeas produzem novos ovos (EPE, 2009). Dentre os principais sinais clínicos estão a diarreia, vômito, anorexia, tosse e edema pulmonar (MORAES; LEITE; GOULART, 2000).

2.2.4 Tricuriose

A tricuriose é uma doença provocada pela ingestão de ovos do parasita *Thichuris vulpis*, que, no intestino dos cães, se desenvolverá em larvas. A maioria das infecções não provoca sinais clínicos, no entanto pode ocorrer diarreia com muco e, em alguns casos, sangue (EPE, 2009).

2.3 ZOONOSES

Em paralelo a essas parasitoses que prejudicam a saúde dos animais, estão as zoonoses devido ao estreitamento da relação homem-animal. Dentre as principais destacam-se a larva *migrans* cutânea e a larva *migrans* visceral.

2.3.1 Larva *migrans* cutânea

A larva *migrans* cutânea, conhecida como dermatite serpiginosa ou popularmente “bicho geográfico”, é uma dermatite provocada pela migração de larvas de nematódeos, presentes em solos contaminados por fezes de cães e gatos, em um hospedeiro não habitual, o homem. As larvas, ao entrar em contato com a pele humana, perfuram o estrato epitelial, provocando lesões, eritema, prurido e inflamação (HEUKELBACH; FELDMEIER, 2008; BOWMAN *et al.*, 2010). No Brasil, o *Ancylostoma braziliense* e o *Ancylostoma caninum* constituem os principais nematódeos envolvidos (ARAÚJO *et al.*, 2000; GUIMARÃES *et al.*, 2005).

2.3.2 Larva *migrans* visceral

A larva *migrans* visceral ou toxocaríase é uma doença causada pela ingestão acidental de ovos embrionados dos nematódeos *Toxocara canis* e

Toxocara cati, sendo a população sujeita ao risco de contágio constituída principalmente por crianças, muito propensas a fazer sua exploração do mundo usando as mãos e a boca (SANTARÉM *et al.*, 2009).

Na espécie humana a ingestão de ovos embrionados de *Toxocara* spp. é seguida pela eclosão e liberação das larvas nas porções altas do intestino delgado que, após invadirem a mucosa, podem entrar na circulação venosa e seguir para o fígado, coração, olhos e pulmões (MORAES; LEITE; GOULART, 2000). O quadro clínico, que depende da intensidade do parasitismo e da localização, envolve febre, tosse e dificuldade respiratória podendo evoluir para hepatite, infiltração pulmonar e asma brônquica (REY, 2008).

2.4 TERAPÊUTICA

O controle das zoonoses tem por base medidas preventivas, como a higiene das mãos após brincar com o animal, a proibição do acesso desses animais a parques, praias e espaços destinados à recreação das crianças, a redução da população de cães e gatos abandonados, a conscientização de proprietários para que recolham os dejetos deixados por seus animais em locais públicos e a vermifugação periódica desses animais (CRIPPS, 2000; GUIMARÃES *et al.*, 2005; HEUKELBACH; FELDMEIER, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2008).

A vermifugação periódica é o fator chave tanto para preservar a saúde dos animais quanto para reduzir o risco das zoonoses e consiste na administração de um medicamento antiparasitário com a finalidade de eliminar os vermes presentes no organismo dos cães e gatos (HEUKELBACH; FELDMEIER, 2008; SANTARÉM *et al.*, 2009). Atualmente existem diferentes antiparasitários disponíveis no mercado, sendo que grande parte associa mais de um anti-helmíntico como ivermectina, febantel, praziquantel e pamoato de pirantel.

2.4.1 Ivermectina

As avermectinas são produtos obtidos por fermentação de fungos do gênero *Streptomyces* e apresentam em sua estrutura química uma lactona macrocíclica ligada a dois açúcares (BARRAGRY, 1987). Dentro desse grupo de avermectinas está a ivermectina, comercializada pela primeira vez em 1981 pela empresa Merck Sharp and Dohme como um agente antiparasitário. Ela consiste em uma mistura de duas avermectinas, sendo cerca de 80% ivermectina B1a e 20% de ivermectina B1b, conforme ilustrado na Figura 1 (GONZALEZ CANGA *et al.*, 2009).

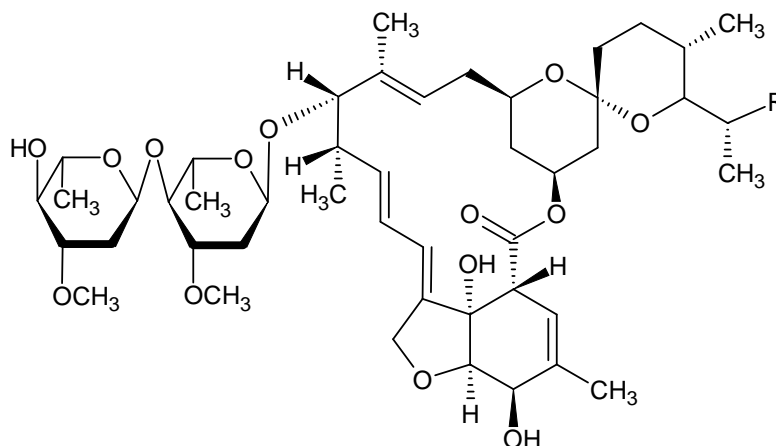
O mecanismo de ação da ivermectina ocorre pela ativação dos canais de cloro controlados tanto por glutamato quanto pelo ácido gama-aminobutírico (GABA). A abertura dos canais de cloro permite o influxo de íons cloreto que promovem a paralisia da musculatura e morte do parasita (ARENA *et al.*, 1995; GEARY, 2005).

Os canais de cloro controlados pelo glutamato estão presentes somente nos invertebrados, o que justifica a atividade somente nos parasitas. Além disso, nos mamíferos os canais iônicos mediados pelo GABA estão presentes somente no cérebro e, como a ivermectina não atravessa a barreira hematoencefálica em condições normais, não ocorre ação (GEARY, 2005). Entretanto, inúmeros autores relatam casos de intoxicação de cães, em especial da raça Collie, após o uso de ivermectina dentro das dosagens indicadas. Essa intoxicação está relacionada com a ausência ou deficiência funcional da glicoproteína-P, que limita a absorção da ivermectina pelo cérebro, evitando a neurotoxicidade (GONZALEZ CANGA *et al.*, 2009).

Desde a sua introdução no mercado, inúmeros estudos farmacocinéticos têm sido realizados, afirmando que tanto a via de administração quanto a composição da formulação afetam fortemente a sua biodisponibilidade, sendo que para cães a biodisponibilidade oral é maior quando comprimidos mastigáveis são administrados. Possui um amplo espectro de ação contra espécies de nematódeos, incluindo formas larvais e adultas. A dose recomendada para cães é de 6 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (GONZALEZ CANGA *et al.*, 2009).

A ivermectina (mistura das avermectinas B1a e B1b), matéria-prima, é um pó cristalino branco ou quase branco, praticamente insolúvel em água, livremente solúvel em diclorometano e solúvel em etanol. Possuem como fórmulas moleculares

$C_{48}H_{74}O_{14}$ para a ivermectina B1a e $C_{47}H_{72}O_{14}$ para a ivermectina B1b, com pesos moleculares de 875 e 861 $g.mol^{-1}$, respectivamente (EUROPEAN, 2007). A fórmula estrutural da ivermectina (B1a e B1b) está representada na Figura 1.



R = CH_2CH_3 - Ivermectina B1a (5-O-dimetil-22,23-di-hidroavermectina A1a)

R = CH_3 - Ivermectina B1b (5-O-dimetil-25-di-(1-metilpropil)-25-(1-metiletil)-22,23-di-hidroavermectina A1a)

FIGURA 1 – FÓRMULA ESTRUTURAL DA IVERMECTINA (B1a E B1b).

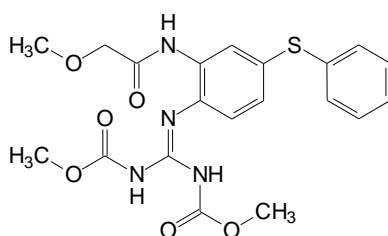
FONTE: EUROPEAN, 2007

2.4.2 Febantel

O febantel é um anti-helmíntico pró-benzimidazólico de amplo espectro que tem aprovação da Food and Drug Administration (FDA) para uso em cães e gatos (FDA, 2010). Para esses animais, acima de seis meses de idade, a dose de 10 mg.kg^{-1} é usada uma vez ao dia, por três dias consecutivos. Essas dosagens são eficazes para expelir infestações do *Ancylostoma caninum*, *Toxocara canis*, *Toxocara cati* e *Taenia* spp (REINEMEYER; COURTNEY, 2003a)

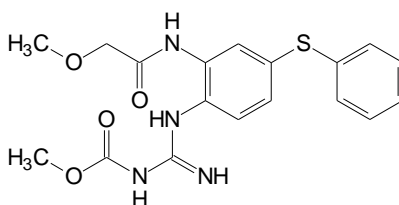
Após a administração de doses terapêuticas, o febantel é rapidamente metabolizado em febendazol e oxfendazol que, por serem metabólitos ativos, atuam sobre os parasitos impedindo a síntese de microtúbulos pela inibição de β -tubulina, o que interrompe a migração dos cromossomos durante a mitose e meiose, e reduz o transporte de vesículas secretoras e do consumo de glicose, levando o parasita à morte (ANDRADE; SANTARÉM, 2002).

O febantel, matéria-prima, é um pó cristalino branco ou quase branco, praticamente insolúvel em água, solúvel em acetona e levemente solúvel em etanol anidro. O ponto de fusão compreende a faixa de 129 a 130°C. Possui como fórmula molecular $C_{20}H_{22}N_4O_6S$ e peso molecular de 446,5 g.mol⁻¹ (BUDAVARI, 1996; EUROPEAN, 2007). Apresenta três impurezas, nomeadas pela Farmacopéia Européia (2007) como A, B e C, sendo que a C, febendazol, é também um metabólito ativo do febantel como citado anteriormente. A estrutura química do febantel e de suas impurezas estão representadas na Figura 2.



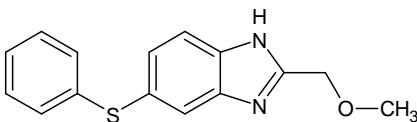
Febantel

(*N,N'*-[[[2-[(metoxiacetil)amino]-4-fenilsulfanil]fenil]imino]metileno]dicarbamato de dimetila)



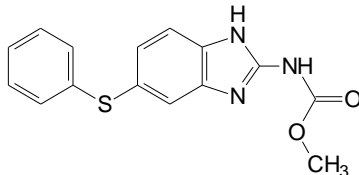
Impureza A

(*N'*-{2-[(metoxiacetil)amino]-4-(fenilsulfanil)fenil}carbamiimidol)carbamato de metila)



Impureza B

(2-(metoximetil)-5(fenilsulfanil)-¹H-benzimidazol)



Impureza C

([5-(fenilsulfanil)-¹H-benzimidazol-2-il]carbamato de metila)
(febendazol)

FIGURA 2 – FÓRMULAS ESTRUTURAIS DO FEBANTEL E RESPECTIVAS IMPUREZAS.
FONTE: EUROPEAN, 2007

2.4.3 Praziquantel

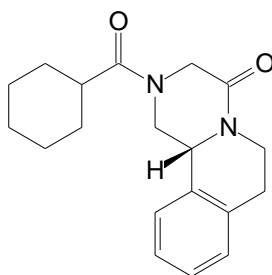
O praziquantel pertence ao grupo farmacológico das isoquinolonas e é conhecido por sua atividade sobre os cestódeos das famílias *Taeniidae* e *Dilepididae* de cães e gatos (ALMEIDA; AYRES, 2002a).

A dose terapêutica é de 3,8 - 12,5 mg.kg⁻¹ nos cães e 4,2 - 12,7 mg.kg⁻¹ nos gatos. Superdosagens de até cinco vezes são toleradas, sem efeitos adversos, entretanto doses dez vezes maiores provocam vômito transitório e depressão, tanto em cães como em gatos, sendo que doses vinte vezes maiores (200 mg.kg⁻¹) podem ser fatais para os gatos (REINEMEYER; COURTNEY, 2003b).

O praziquantel é rápido e quase completamente absorvido no trato alimentar após a administração oral, sendo que as concentrações plasmáticas máximas são obtidas após 30-120 minutos nos cães. É distribuído para todos os órgãos e metabolizado a formas inativas no fígado (REINEMEYER; COURTNEY, 2003b).

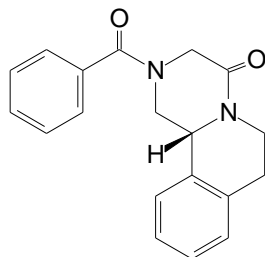
O mecanismo de ação consiste no aumento da permeabilidade da membrana tegumentar e muscular, o que promove lesões superficiais, perda de íons cálcio, contrações e paralisia da musculatura do parasita, causando sua morte (ANDRADE; SANTARÉM, 2002).

O praziquantel, como matéria-prima, apresenta-se na forma de um pó cristalino, de cor branca ou quase branca, muito pouco solúvel em água, livremente solúvel em álcool e em diclorometano. O ponto de fusão compreende a faixa de 136 a 138°C. Possui a fórmula molecular C₁₉H₂₄N₂O₂ e peso molecular de 312,4 g.mol⁻¹ (BUDAVARI, 1996; EUROPEAN, 2007). Pode apresentar segundo a Farmacopéia Européia (2007) três impurezas, A, B e C. As estruturas químicas do praziquantel e suas impurezas estão ilustradas na Figura 3.



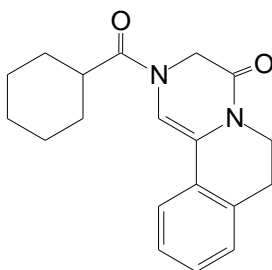
Praziquantel

((11b*R*)-2-(Ciclo-hexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexa-hidro-4*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-4-ona



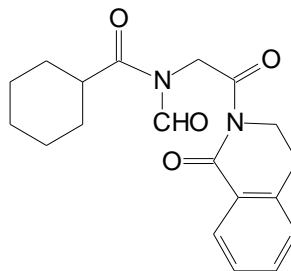
Impureza A

((11b*R*)-2-benzoil-1,2,3,6,7,11b-hexa-hidro-4*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-4-ona)



Impureza B

(2-(ciclo-hexilcarbonil)-2,3,6,7-tetra-hidro-4*H*-pirazino[2,1-*a*]isoquinolin-4-ona)



Impureza C

(*N*-formil-*N*-[2-oxo-2-(1-oxo-3,4-di-hidroisoquinolin-2(1*H*)-il)etil]ciclo-hexanocarboxamida)

FIGURA 3 – FÓRMULAS ESTRUTURAIS DO PRAZIQUANTEL E RESPECTIVAS IMPUREZAS
FONTE: EUROPEAN, 2007

2.4.4 Pamoato de pirantel

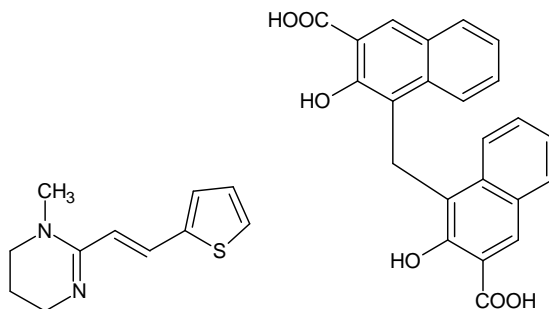
O pirantel foi introduzido como anti-helmíntico pirimidínico de amplo espectro em 1966 e é eficaz contra os ancilostomídeos comuns (*Ancylostoma caninum* e *Ancylostoma tubaeforme*) e ascarídeos (*Toxocara canis* e *Toxocara cati*) dos cães, na dose única de 5 mg.kg⁻¹ e dos gatos, na dose de 20 mg.kg⁻¹ (REINEMEYER; COURTNEY, 2003a).

Após a administração oral, o fármaco é rapidamente metabolizado no fígado, sendo a maior parte excretada de forma inalterada nas fezes, exceto nos cães, em que 40% da dose é excretada pela urina (ALMEIDA; AYRES, 2002b).

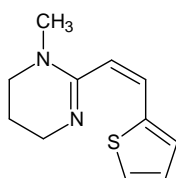
Esse fármaco é um agonista colinérgico que promove um excesso de despolarização da membrana com sucessivas contrações, o que provoca a morte do parasita por paralisia (ANDRADE; SANTARÉM, 2002).

A matéria-prima do pamoato de pirantel apresenta-se como um pó de cor amarelo claro a amarelo, praticamente insolúvel em água e metanol e solúvel em dimetilsulfóxido. Possui como fórmula molecular C₃₄H₃₀N₂O₆S e peso molecular de 594,7 g.mol⁻¹ (EUROPEAN, 2007). Apresenta três impurezas, A, B e C, segundo a Farmacopéia Européia (2007). As estruturas químicas do pamoato de pirantel e de suas impurezas estão ilustradas na Figura 4.

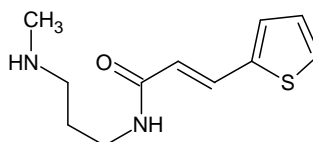
Os sais de pirantel são relativamente estáveis na fase sólida; as soluções aquosas, entretanto, são submetidas à fotoisomerização por exposição à luz, com perda resultante de potência (ANDRADE; SANTARÉM, 2002).



Pamoato de pirantel
(Hidrogênio 4,4'-metileno-bis(3-hidroxi-naftaleno-2-carboxilato de 1-metil-2-[(E)-2-(tiofen-2-il)etenil]-1,4,5,6-tetra-hidropirimidina)



Impureza A
(1-metil-2-[(Z)-2-(tiofen-2-il)etenil]⁺,4,5,6-tetra-hidropirimidina)



Impureza B
(*(2E)*-N-[3-(metilamino)propil]-3-(tiofen-2-il)prop-2-enamida)

FIGURA 4 – FÓRMULAS ESTRUTURAIS DO PAMOATO DE PIRANTEL E RESPECTIVAS IMPUREZAS.
FONTE: EUROPEAN, 2007

2.4.5 Associação de fármacos

Os fármacos ivermectina, febantel, praziquantel e pamoato de pirantel são aprovados pelo FDA para tratamento de helmintíase em cães e gatos. No Brasil são comercializados associados em comprimidos com dois, três ou ainda quatro desses fármacos. A associação contendo os quatro fármacos é comercializada com o nome de Top Dog (Ourofino), Canex Premium (Ceva Vetbrands) e Endogard (Virbac).

Vários estudos têm comprovado a eficácia da associação desses fármacos. Segundo Montoya e colaboradores (2008), a administração da associação de

febantel, pamoato de pirantel e praziquantel foi altamente efetiva no tratamento de cachorros infectados por *Giardia* sp. Taweethavonsawat e colaboradores (2010), concluíram que essa mesma associação também é eficaz no tratamento de cachorros infectados por *Ancylostoma ceylanicum*, diminuindo a contaminação do ambiente e consequentemente o risco de transmissão aos humanos. Mehlhorn e colaboradores (2003) avaliaram e confirmaram o efeito sinérgico da associação de pamoato de pirantel e do febendazol, metabólito do febantel, contra *Toxocara canis*. E ainda, para a associação de ivermectina e pamoato de pirantel, Nolan e colaboradores (1992) e Shoop e colaboradores (1996), afirmaram a eficácia contra *Ancylostoma caninum* e *Ancylostoma braziliense*, respectivamente.

2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE IVERMECTINA, FEBANTEL, PRAZICUANTEL E PAMOATO DE PIRANTEL

Os métodos encontrados em literatura para quantificação desses fármacos são, em sua grande maioria, realizados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), variando apenas o tipo de detector, como ultravioleta (UV), arranjo de diodos (DAD) ou espectrômetro de massas, com o recurso da espectrometria de massas sequencial (EM/EM).

2.5.1 Métodos analíticos aplicados ao fármaco ivermectina

Para quantificação da ivermectina em matéria-prima, tanto a Farmacopéia Européia (EUROPEAN, 2007) quanto a Farmacopéia Americana (USP, 2008) descrevem método por CLAE-UV. A Farmacopéia Americana (USP, 2008) também descreve metodologia por CLAE-UV para doseamento da ivermectina em injetável, pasta, solução e comprimidos. Foram encontradas na literatura metodologias por cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao espectrômetro de massas, com o recurso da espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM e CLUE-EM/EM, respectivamente) para quantificação da

ivermectina no leite (DURDEN, 2007; KINSELLA *et al.*, 2009; MARTINEZ VIDAL *et al.*, 2010; WHELAN *et al.*, 2010), alimentos (HERNANDO *et al.*, 2007), plasma (CROUBELS *et al.*, 2002) e tecido animal (INOUE *et al.*, 2009). Método por infusão direta no espectrômetro de massas também foi encontrado para identificação da ivermectina em tecido animal, a fim de avaliar possíveis casos de intoxicação (LEHNER *et al.*, 2009). Os principais parâmetros destes métodos estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO FÁRMACO IVERMECTINA (continua)

Tipo de amostra	Preparo da amostra	Método utilizado	Condições de análise	Referência
Matéria-prima	A amostra é dissolvida e diluída em metanol.	CLAE-UV	Coluna: C18 250 X 4,6 mm, 5 µm Fase móvel: água/metanol/ acetonitrila 19,5:27,5:53 v/v , em modo isocrático Volume de injeção: 50 µL Fluxo: 1,5 mL.min ⁻¹ Detector UV: 254 nm	USP, 2008
Injetável, pasta, solução tópica	A amostra é dissolvida e diluída em metanol.	CLAE-UV	Coluna: C18 250 X 4,6 mm, 5 µm Fase móvel: água/metanol/ acetonitrila 39:55:106 v/v , em modo isocrático Volume de injeção: 20 µL Fluxo: 1,5 mL.min ⁻¹ Detector UV: 245 nm	USP, 2008
Comprimidos	A amostra é transferida para um balão volumétrico de 250 mL e a extração é realizada com 25 mL de água e 175 mL de metanol através de sonicação.	CLAE-UV	Coluna: C18 250 X 4,6 mm, 5 µm Fase móvel: água/metanol/ acetonitrila 12:35:53 v/v , em modo isocrático Volume de injeção: 10 µL Fluxo: 1,2 mL.min ⁻¹ Detector UV: 245 nm	USP, 2008

TABELA 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO FÁRMACO IVERMECTINA (continuação)

Tipo de amostra	Preparo da amostra	Método utilizado	Condições de análise	Referência
Matéria-prima	A amostra é dissolvida e diluída em metanol.	CLAE-UV	Coluna: C18 250 X 4,6 mm, 5 µm Fase móvel: água/metanol/ acetonitrila 15:34:51 v/v , em modo isocrático Volume de injeção: 20 µL Fluxo: 1 mL.min ⁻¹ Detector UV: 254 nm	EUROPEAN, 2007
Leite	Extração realizada através da adição de acetonitrila contendo 1% de ácido acético, EDTA dissódico, sulfato de magnésio e acetato de sódio ao leite. Após centrifugação, o sobrenadante é coletado, misturado com fase móvel e injetado no cromatógrafo.	CLUE-EM/EM	Coluna: C18 100 X 2,1 mm, 1,7 µm Fase móvel: gradiente de metanol/água contendo 0,05% de ácido fórmico Volume de injeção: 5 µL Fluxo: 0,3 mL.min ⁻¹ Ionização: ESI no modo positivo	MARTINEZ VIDAL <i>et al.</i> , 2010
Leite	Extração realizada através da adição de acetonitrila, sulfato de magnésio e cloreto de sódio às amostras.	CLUE-EM/EM	Coluna: C18 100 X 2,1 mm, 1,8 µm Fase móvel: gradiente de fase móvel A acetonitrila/água contendo 0,01% de ácido acético e fase móvel B acetonitrila/metanol contendo formiato de amônio 5 mmol.L ⁻¹ Volume de injeção: 5 µL Fluxo: 0,6 mL.min ⁻¹ Ionização: ESI no modo positivo	WHELAN <i>et al.</i> , 2010

TABELA 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO FÁRMACO IVERMECTINA (continuação)

Tipo de amostra	Preparo da amostra	Método utilizado	Condições de análise	Referência
Tecido bovino	Extração líquido-líquido realizada com isoctano. O resíduo evaporado foi reconstituído em metanol.	CLAE-EM/EM	Coluna: C18 50 X 2 mm, 3 µm Fase móvel: gradiente acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico e água contendo 0,1% de ácido fórmico e formiato de amônio 0,1 mmol.L ⁻¹ Volume de injeção: 10 µL Fluxo: 0,2 mL.min ⁻¹ Ionização: ESI no modo positivo	INOUE <i>et al.</i> , 2009
Tecido canino	Extração realizada com álcool etílico.	EM/EM	Infusão direta no modo positivo de ionização Diluyente: acetonitrila/água contendo 0,1% de ácido fórmico 1:1 v/v Fluxo da bomba seringa: 1,5 mL.h ⁻¹ Voltagem do capilar: 3,22 kV Temperatura da fonte: 150°C Energia de ionização: 0,2 e 3,9 V Energia de colisão: 30 e 60 eV	LEHNER <i>et al.</i> , 2009
Leite e fígado bovino	Extração realizada através da adição de acetonitrila, sulfato de magnésio e cloreto de sódio às amostras.	CLAE-EM/EM	Pré-coluna: C18 4 x 3 mm Coluna: C18 150 X 3 mm, 5 µm Fase móvel: gradiente de fase móvel A formiato de amônio aquoso 25 mmol.L ⁻¹ em pH 4,0 e fase móvel B metanol/acetonitrila contendo formiato de amônio 12,5 mmol.L ⁻¹ Volume de injeção: 10 µL Fluxo: 0,3 mL.min ⁻¹ Ionização: ESI no modo positivo	KINSELLA <i>et al.</i> , 2009

TABELA 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO FÁRMACO IVERMECTINA (conclusão)

Tipo de amostra	Preparo da amostra	Método utilizado	Condições de análise	Referência
Alimentos	Extração realizada através da adição de acetonitrila contendo 0,1% de ácido acético e cloreto de sódio às amostras, seguida por limpeza em cartuchos contendo alumina. O eluato foi evaporado e posteriormente reconstituído em acetonitrila:água 20:80 v/v.	CLAE-EM/EM	Coluna: C8 50 X 4,6 mm, 1,8 µm Fase móvel: gradiente de acetonitrila/água contendo formiato de amônio 0,2% Volume de injeção: 10 µL Fluxo: 0,2 mL.min ⁻¹ Ionização: ESI no modo positivo	HERNANDO <i>et al.</i> , 2007
Leite	Extração realizada através da adição de acetonitrila, seguida por centrifugação. O sobrenadante foi aplicado em um cartucho de extração em fase sólida e o eluato evaporado foi posteriormente reconstituído em acetonitrila:água 50:50 v/v.	CLAE-EM/EM	Pré-coluna: C18 20 x 3 mm Coluna: C18 100 X 3 mm, 3,5 µm Fase móvel modo negativo: acetonitrila/água contendo trietilamina 10 mmol.L ⁻¹ 75:25 v/v, em modo isocrático Fase móvel modo positivo: acetonitrila/ácido fórmico aquoso 1%/água 75:10:15 v/v ou acetonitrila/ácido fórmico aquoso 1% com formiato de amônio 3 mmol.L ⁻¹ /água 75:10:15 v/v, em modo isocrático Volume de injeção: 70 µL para modo negativo e 35 µL para modo positivo Fluxo: 0,35 mL.min ⁻¹ Ionização: ESI no modo negativo e positivo	DURDEN, 2007
Plasma animal	Extração realizada através da adição de acetonitrila, seguida por centrifugação. O sobrenadante foi injetado no cromatógrafo.	CLAE-EM/EM	Pré-coluna: C18 10 x 2 mm Coluna: C18 100 X 3 mm, 5 µm Fase móvel: gradiente de acetonitrila/água, ambos contendo 0,2% de ácido acético Volume de injeção: 100 µL Fluxo: 0,6 mL.min ⁻¹ Ionização: ESI no modo positivo	CROUBELS <i>et al.</i> , 2002

2.5.2 Métodos analíticos aplicados ao fármaco febantel

Para quantificação do febantel em matéria-prima a Farmacopéia Européia (EUROPEAN, 2007) descreve um método por CLAE-UV, porém, não define método para comprimidos. A Farmacopéia Brasileira, Americana e Japonesa não apresentam método de quantificação do febantel até o momento. Por outro lado foram encontradas na literatura métodos por CLAE-UV para quantificação do febantel em ração (DUSI; GAMBA; FAGGIONATO, 2005), em produtos de origem animal (SU *et al.*, 2004) e do febantel e seus maiores metabólitos em plasma animal (DELATOUR; TIBERGHIE; BESSE, 1983; LANDUYT *et al.*, 1993) Métodos por CLAE-EM-EM foram encontrados para quantificação do febantel em efluentes da indústria farmacêutica (BABIC *et al.*, 2010), em produtos de origem animal (BALIZS, 1999) e no leite (DE RUYCK *et al.*, 2002). Os principais parâmetros destes métodos estão descritos na Tabela 2.

TABELA 2 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO FÁRMACO FEBANTEL (continua)

Tipo de amostra	Preparo da amostra	Método utilizado	Condições de análise	Referência
Matéria-prima	Amostra preparada em mistura de acetonitrila e tetrahydrofurano 50:50 v/v	CLAE-UV	Coluna: C18 150 X 3,9 mm, 5 µm Fase móvel: 650 mL de solução de dihidrogenofosfato de potássio a 0,68% + 350 mL de acetonitrila, em modo isocrático Fluxo: 1 mL.min ⁻¹ Detector UV: 280 nm	EUROPEAN, 2007
Ração animal	Extração realizada com dimetilformamida.	CLAE-UV	Pré-coluna: C18 20 x 4,6 mm, 5 µm Coluna: C18 150 X 4,6 mm, 5 µm Fase móvel: gradiente de acetonitrila/tampão fosfato 0,017 mol.L ⁻¹ e pH 3,0 Volume de injeção: 10 µL Fluxo: 1 mL.min ⁻¹ Detector UV: 300 nm	DUSI; GAMBA; FAGGIONATO, 2005
Efluentes da indústria farmacêutica	Pré-concentração e limpeza por extração em fase sólida com pH 4,0.	CLAE-EM/EM	Coluna: C18 150 X 2 mm, 4 µm Fase móvel: gradiente de acetonitrila/água contendo 0,1% de ácido fórmico Volume de injeção: 5 µL Fluxo: 0,2 mL.min ⁻¹ Ionização: ESI no modo positivo	BABIC <i>et al.</i> , 2010
Produtos de origem animal	Dois tipos de extração. Uma realizada em cartucho de extração em fase sólida C18 com acetonitrila alcalinizada e outra em matriz de dispersão em fase sólida com acetonitrila como eluente.	CLAE-UV	Coluna: C18 250 X 4,6 mm, 5 µm Fase móvel: gradiente de acetonitrila/dihidrogeno fosfato de amônio 0,01 mol.L ⁻¹ Volume de injeção: 50 µL Fluxo: 1 mL.min ⁻¹ Detector UV: 298 nm	SU <i>et al.</i> , 2004

TABELA 2 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO FÁRMACO FEBANTEL (conclusão)

Tipo de amostra	Preparo da amostra	Método utilizado	Condições de análise	Referência
Leite	A extração foi realizada com acetato de etila e o resíduo evaporado foi reconstituído em fase móvel.	CLAE-EM/EM	Pré-coluna: C18 75 x 2,1 mm Coluna: C18 150 X 2,1 mm, 5 µm Fase móvel: gradiente de acetonitrila/água contendo 0,1% de ácido fórmico Volume de injeção: 20 µL Fluxo: 0,25 mL.min ⁻¹ Ionização: ESI no modo positivo	DE RUYCK <i>et al.</i> , 2002
Produtos de origem animal	A extração foi realizada com acetato de etila seguida por limpeza em cartucho de extração em fase sólida de estírol-divinil- benzeno (SDB). O resíduo evaporado foi reconstituído em fase móvel.	CLAE-EM/EM	Coluna: C18 150 X 2,1 mm, 5 µm Fase móvel: acetonitrila/água contendo 0,01 mol.L ⁻¹ acetato de amônio e 0,5% de ácido acético Volume de injeção: 15 µL (turbo íon spray) Fluxo: 200 µL.min ⁻¹ (turbo íon spray) Ionização: ESI no modo positivo Detector DAD: 190 a 380 nm	BALIZS, 1999
Plasma animal	Padrões preparados com dimetilsulfóxido. Extração do plasma realizada com éter e o resíduo evaporado ressuspensão em metanol.	CLAE-UV	Coluna: C18 100 X 1,3 mm, 5 µm Fase móvel: acetonitrila/água 43:57 v/v em 1% de ácido acético, no modo isocrático Volume de injeção: 20 µL Fluxo: 0,9 mL.min ⁻¹ Detector UV: 292 nm	LANDUYT <i>et al.</i> , 1993
Plasma animal	Padrões preparados com dimetilformamida. Extração do plasma realizada com éter e o resíduo evaporado ressuspensão em dimetilformamida.	CLAE-UV	Coluna: C8 250 X 4 mm, 10 µm Fase móvel: gradiente de acetonitrila/água em 1% de ácido fosfórico Volume de injeção: 20 µL Fluxo: 2 mL.min ⁻¹ Detector UV: 290 nm	DELATOUR; TIBERGHIE; BESSE, 1983

2.5.3 Métodos analíticos aplicados ao fármaco praziquantel

Para quantificação do praziquantel em matéria-prima, tanto a Farmacopéia Britânica (BRITISH, 2005) quanto a Farmacopéia Européia (EUROPEAN, 2007) e Farmacopéia Americana (USP, 2008) descrevem métodos por CLAE-UV. A Farmacopéia Americana (USP, 2008) também descreve metodologia por CLAE-UV para doseamento de praziquantel em comprimidos. Foram encontradas na literatura metodologias por CLAE-UV para quantificação do praziquantel em comprimidos (LI *et al.*, 2007), em plasma (JABOR; ROCHA; BONATO, 1997; LIU; STEWART, 1997; RIDTITID *et al.*, 2002; HANPITAKPONG *et al.*, 2004) e em estudo de permeação intestinal (CINTO *et al.*, 2009). Métodos por CLAE-EM/EM foram encontrados para quantificação do praziquantel em plasma (BONATO *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2009) e por voltametria de pulso diferencial em medicamentos e plasma (GHONEIM; MABROUK; TAWFIK, 2002). Os principais parâmetros destes métodos estão descritos na Tabela 3.

TABELA 3 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO FÁRMACO PRAZICUANTEL (continua)

Tipo de amostra	Preparo da amostra	Método utilizado	Condições de análise	Referência
Materia-prima e comprimidos	A amostra é dissolvida e diluída em fase móvel.	CLAE-UV	Coluna: C18 250 X 4 mm, 5 µm Fase móvel: acetonitrila/água 60:40 v/v, em modo isocrático Fluxo: 1,5 mL.min ⁻¹ Detector UV: 210 nm	USP, 2008
Materia-prima	A amostra é dissolvida e diluída em fase móvel.	CLAE-UV	Coluna: C18 250 X 4 mm, 5 µm Fase móvel: acetonitrila/água 45:55 v/v, em modo isocrático Fluxo: 1 mL.min ⁻¹ Detector UV: 210 nm	EUROPEAN, 2007
Materia-prima	A amostra é dissolvida e diluída em fase móvel.	CLAE-UV	Coluna: C18 250 X 4 mm, 5 µm Fase móvel: acetonitrila/água 45:55 v/v, em modo isocrático Fluxo: 1 mL.min ⁻¹ Detector UV: 210 nm	BRITISH, 2005
Estudo de permeação intestinal	Padrão foi preparado em solução tampão TC-199	CLAE-UV	Coluna: C18 250 X 4,6 mm, 5 µm Fase móvel: acetonitrila/água 45:55 v/v, em modo isocrático Fluxo: 1 mL.min ⁻¹ Detector UV: 215 nm	CINTO <i>et al.</i> , 2009

TABELA 3 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO FÁRMACO PRAZICUANTEL (continuação)

Tipo de amostra	Preparo da amostra	Método utilizado	Condições de análise	Referência
Plasma humano	A extração foi realizada com éter-metil-tert-butílico/diclorometano 2:1 v/v e o resíduo evaporado foi reconstituído em fase móvel.	CLAE-EM/EM	Pré-coluna: CN 4 x 4 mm Coluna: Quiral 250 X 4,6 mm, 10 µm Fase móvel: hexano/ isopropanol 75:25 v/v Volume de injeção: 130 µL Fluxo: 1,2 mL.min ⁻¹ Ionização: ESI no modo positivo	LIMA <i>et al.</i> , 2009
Plasma humano	A extração foi realizada com diclorometano e o resíduo evaporado foi reconstituído em fase móvel.	CLAE-EM/EM	Pré-coluna: CN 4 x 4 mm Coluna: Quiral 125 X 4,6 mm, 5 µm Fase móvel: metanol/água 30:70 v/v contendo 0,5% ácido acético Volume de injeção: 50 µL Fluxo: 1,0 mL.min ⁻¹ Ionização: ESI no modo positivo	BONATO <i>et al.</i> , 2007
Comprimidos	Comprimidos foram triturados e dissolvidos em acetônitrila:água 50:50 v/v.	CLAE-UV	Coluna: C18 50 X 4,6 mm, 5 µm Fase móvel: gradiente de acetônitrila/água 40:60 para 80:20 v/v Volume de injeção: 100 µL Fluxo: 1 mL.min ⁻¹ Detector UV: 262,5 nm	LI <i>et al.</i> , 2007
Plasma humano	Amostras foram extraídas com éter-metil-tert-butílico/diclorometano 2:1 v/v e centrifugadas. A camada orgânica foi coletada, evaporada e reconstituída com 200 µL de fase móvel.	CLAE-UV	Coluna: C18 250 X 4,6 mm, 5 µm Fase móvel: acetônitrila/água 70:30 v/v, em modo isocrático Volume de injeção: 100 µL Fluxo: 1 mL.min ⁻¹ Detector UV: 217 nm	HANPITAKPONG <i>et al.</i> , 2004

TABELA 3 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO FÁRMACO PRAZICQUANTEL (conclusão)

Tipo de amostra	Preparo da amostra	Método utilizado	Condições de análise	Referência
Plasma humano	Extração realizada com sulfato de zinco $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e acetônitrila.	CLAE-UV	Coluna: C18 250 X 4,6 mm, 5 μm Fase móvel: acetônitrila/metanol/água 36:54:10 v/v, em modo isocrático Volume de injeção: 100 μL Fluxo: 1,5 mL min^{-1} Detector UV: 217 nm	RIDTID <i>et al.</i> , 2002
Medicamentos e plasma humano	O plasma foi diluído em etanol, centrifugado e posteriormente o sobrenadante foi filtrado. Os comprimidos foram triturados e dissolvidos com etanol.	Voltametria de pulso diferencial	O comportamento voltamétrico do praziquantel foi estudado em diferentes valores de pH de tampão.	GHONEIM; MABROUK; TAWFIK, 2002
Plasma humano	Amostra extraída em cartucho de extração em fase sólida C18 utilizando acetônitrila como eluente. Após evaporação do solvente a amostra foi reconstituída em fase móvel.	CLAE-UV	Coluna: Quiral 150 X 4,6 mm, 5 μm Fase móvel: perclorato de sódio 0,1 M /acetônitrila 66:34 v/v, em modo isocrático Volume de injeção: 100 μL Fluxo: 0,5 mL min^{-1} Detector UV: 210 nm	LIU; STEWART, 1997
Plasma humano	Amostra foi acidificada com ácido fosfórico 1 mol.L^{-1} e extraída com tolueno. O resíduo evaporado foi reconstituído em fase móvel.	CLAE-UV	Pré-coluna: CN 4 x 4 mm, Merck Coluna: Quiral 150 X 4,6 mm, 5 μm Fase móvel: hexano/etanol 85:15 v/v, em modo isocrático Fluxo: 1 mL min^{-1} Detector UV: 220 nm	JABOR; ROCHA; BONATO, 1997

2.5.4 Métodos analíticos aplicados ao fármaco pamoato de pirantel

Para quantificação do pamoato de pirantel em matéria-prima, a Farmacopéia Européia (EUROPEAN, 2007) descreve método de titulação em meio não aquoso enquanto que a Farmacopéia Americana (USP, 2008) descreve método por CLAE-UV. A Farmacopéia Americana (USP, 2008) também descreve uma metodologia por CLAE-UV para doseamento do pamoato de pirantel em suspensão oral. Foram encontradas na literatura metodologias por CLAE-UV para quantificação do pamoato de pirantel em ração animal (THORPE, 1988; SABBATINI, 2009), comprimidos, matéria-prima (ALLENDER, 1988; ARGEKAR; RAJ; KAPADIA, 1997) e plasma (FASANMADE *et al.*, 1994). Métodos espectrofotométricos e por voltametria foram desenvolvidos tanto para matéria-prima quanto para medicamentos (FORCIER; MUSHINSKY; WAGNER, 1971; JAIN; JADON; RADHAPYARI, 2006). Já para produtos de origem animal foi desenvolvido um método por CLAE-EM/EM (YAMADA *et al.*, 2006). Os principais parâmetros destes métodos estão descritos na Tabela 4.

TABELA 4 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO FÁRMACO PAMOATO DE PIRANTEL (continua)

Tipo de amostra	Preparo da amostra	Método utilizado	Condições de análise	Referência
Matéria-prima e Suspensão Oral	Amostra preparada em fase móvel.	CLAE-UV	Coluna: Sílica 250 X 4,6 mm, 5 µm Fase móvel: acetonitrila/ácido acético/água/dietilamina 92,8:3:3:1,2 v/v, em modo isocrático Volume de injeção: 20 µL Fluxo: 1 mL.min ⁻¹ Detector UV: 288 nm	USP, 2008
Matéria-prima	Amostra preparada com anidrido acético e ácido acético glacial.	Titulação potencio-métrica	Titulação com ácido perclórico 0,1 mol.L ⁻¹ .	EUROPEAN, 2007
Ração animal	Extração com acetonitrila/etanol 50:50 v/v, seguida de purificação em cartucho de extração em fase sólida contendo alumina.	CLAE-UV	Coluna: C18 250 X 4,6 mm, 5 µm Fase móvel: gradiente de acetonitrila/água contendo 2,5% de acetato de dibutilamina Volume de injeção: 20 µL Fluxo: 1,5 mL.min ⁻¹ Detector UV: 313 e 365 nm	SABBATINI, 2009
Produtos de origem animal	A extração foi realizada com acetonitrila/metanol 95:5 v/v, seguida de centrifugação. O extrato foi lavado com hexano e o resíduo evaporado foi reconstituído em metanol.	CLAE-EM/EM	Coluna: C18 150 X 2,1 mm Fase móvel: gradiente de acetonitrila-metanol/água contendo 10 mmol.L ⁻¹ acetato de amônio e 0,3% de ácido acético Volume de injeção: não informado Fluxo: 0,22 mL.min ⁻¹ Ionização: ESI no modo positivo	YAMADA <i>et al.</i> , 2006

TABELA 4 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO FÁRMACO PAMOATO DE PIRANTEL (continuação)

Tipo de amostra	Preparo da amostra	Método utilizado	Condições de análise	Referência
Matéria-prima e medicamentos	Amostra dissolvida em dimetilformamida e centrifugada. O sobrenadante foi diluído com tampão na faixa de pH 2,0 a 12,0.	Voltametria	O comportamento voltamétrico do pamoato de pirantel foi examinado na faixa de pH 2,0-12,0.	JAIN; JADON; RADHAPYARI, 2006
Comprimidos	Comprimidos foram triturados e dissolvidos com uma mistura contendo acetonitrila/dietilamina/ácido acético glacial 90:10:10 v/v. Após filtração, uma alíquota foi dissolvida em fase móvel e analisada.	CLAE-UV	Coluna: C8 250 X 3,9 mm, 5 µm Fase móvel: fosfato de sódio monobásico 0,05 mol.L ⁻¹ /acetonitrila/trietilamina 60:40:1,5 v/v, pH 6,8 ajustado com ácido fosfórico diluído, em modo isocrático Volume de injeção: não informado Fluxo: não informado Detector UV: 290 nm	ARGEKAR; RAJ; KAPADIA, 1997
Plasma humano	Não descreve o preparo da amostra.	CLAE-UV	Coluna: Hexilsilano Fase móvel: acetonitrila e ácido fosfórico 0,05 mol.L ⁻¹ em água Volume de injeção: não informado Fluxo: não informado Detector UV: 311 nm	FASANMADE <i>et al.</i> , 1994

TABELA 4 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO FÁRMACO PAMOATO DE PIRANTEL (conclusão)

Tipo de amostra	Preparo da amostra	Método utilizado	Condições de análise	Referência
Matéria-prima e comprimidos	Amostra foi dissolvida em dimetilformamida e na sequência diluída em fase móvel.	CLAE-UV	Coluna: C18 150 X 4,6 mm, 5 µm Fase móvel: acetonitrila/água contendo 0,1 mol.L ⁻¹ de n-butilamina e pH ajustado em 3,0 com ácido perclórico Volume de injeção: não informado Fluxo: 1 mL.min ⁻¹ Detector UV: 313 nm	ALLENDER, 1988
Ração animal	Extração com dimetilformamida/água 95:5 v/v e purificada em alumina.	CLAE-UV	Pré-coluna: C18 100 x 2 mm Coluna: C18 250 x 4,6 mm, 10 µm Fase móvel: ± 25% dimetilformamida em tampão fosfato, pH ajustado para 2,0 com ácido fosfórico Volume de injeção: 20 µL Fluxo: 1,5 mL.min ⁻¹ Detector UV: 313 nm	THORPE, 1988
Matéria-prima e medicamentos	Amostra dissolvida em hidróxido de amônio/1,4-dioxano 1:1 v/v. O ácido pamoico é removido com ácido perclórico e o pirantel base é extraído com clorofórmio.	Espectrofotometria UV-VIS	Comprimentos de onda: 267 e 311 nm Branco: ácido clorídrico 0,02 N	FORCIER; MUSHINSKY; WAGNER, 1971

2.5.5 Métodos analíticos aplicados a associação dos fármacos

Apesar da ausência de método para quantificação simultânea desses quatro fármacos, alguns autores relatam métodos para a associação de dois ou três deles. Morovján e colaboradores (1998) descreveram um método por CLAE-UV para quantificação isolada de pirantel pamoato e quantificação simultânea de praziquantel e febendazol em plasma de cachorro, enquanto que Bialecka; Kulik (2010), descrevem outro método por CLAE-DAD para quantificação simultânea de pamoato de pirantel, febendazol, praziquantel, febantel e epsiprantel em comprimidos de uso veterinário. Os principais parâmetros desses métodos estão descritos na Tabela 5.

TABELA 5 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS À ASSOCIAÇÃO DOS FÁRMACOS

Tipo de amostra	Preparo da amostra	Método utilizado	Condições de análise	Referência
Comprimidos	Os comprimidos foram triturados e solubilizados em dimetilformamida. Em seguida, uma alíquota foi dissolvida em acetonitrila para ser posteriormente injetada no cromatógrafo.	CLAE-DAD	Coluna: C18 250 X 4,6 mm, 5 μ m Fase móvel: gradiente de acetonitrila/água contendo ácido fosfórico a 85%, pH 2,5 Volume de injeção: 10 μ L Fluxo: 1,2 mL.min ⁻¹ Detector DAD: 215, 288 e 312 nm	BIALECKA; KULIK, 2010
Plasma animal	A extração do febendazol e praziquantel da amostra de plasma foi realizada através de cartuchos de extração em fase sólida C18 com acetonitrila/ácido fosfórico a 0,2%, 50:50 v/v.	CLAE-UV	Pré-coluna: C18 20 x 4,6 mm, 5 μ m Coluna: C18 150 X 3,9 mm, 4 μ m Fase móvel: acetonitrila/50 mmol.L ⁻¹ de dihidrogenofosfato de potássio 33:67 v/v, em modo isocrático Volume de injeção: 50 μ L Fluxo: 1,5 mL.min ⁻¹ Detector UV: 220 nm	MOROVJAN <i>et al.</i> , 1998
	A extração do pamoato de pirantel da amostra de plasma foi realizada através de cartuchos de extração em fase sólida C18 com acetonitrila/ácido fosfórico a 1%, 18:82 v/v.	CLAE-UV	Pré-coluna: C18 20 x 3,9 mm Coluna: C18 150 X 2,1 mm, 5 μ m Fase móvel: metanol/tetraidofurano/ tampão acetato de amônio 50 mmol.L ⁻¹ (2,5:2:95,5 v/v), pH ajustado para 4,6 com ácido fosfórico em modo isocrático Volume de injeção: 50 μ L Fluxo: 0,4 mL.min ⁻¹ Detector UV: 317 nm	

2.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é, dentre as técnicas de separação, a que passou a ser mais utilizada nos últimos 40 anos, tanto em laboratórios de análise de indústrias químicas quanto farmacêuticas, devido à sua ampla aplicabilidade (MALDANER; JARDIM, 2009).

A expansão da CLAE permitiu inúmeros avanços no desenvolvimento da técnica, sendo que um dos mais significativos foi a redução do tamanho das partículas e, conseqüentemente, das colunas. Diferentemente da cromatografia líquida clássica (CLC), que faz uso de colunas de vidro, partículas irregulares de 100 a 200 μm e fluxo de fase móvel devido à força da gravidade, a CLAE emprega uma coluna metálica fechada, partículas de 3 a 5 μm e sistemas de bomba de alta pressão que fazem a fase móvel migrar a uma velocidade razoável através da coluna, permitindo até centenas de separações individuais, resultando em operações mais reproduzíveis, rápidas e precisas (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006; MALDANER; JARDIM, 2009).

O princípio de separação em cromatografia líquida é baseado tanto nas características físico-químicas dos analitos quanto nas interações entre a fase estacionária e a fase móvel. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os analitos são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais. Dependendo do mecanismo envolvido na separação é possível classificar essa técnica em cromatografia por troca iônica, cromatografia por exclusão, cromatografia em fase normal e cromatografia em fase reversa (COLLINS, 2006).

A CLAE em fase reversa é uma das técnicas mais utilizadas e difere da fase normal por possuir uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior polaridade, apresentando como principal vantagem o menor custo nas análises. Além disso, desenvolvimentos recentes permitiram a obtenção de fases estacionárias mais seletivas e estáveis, impulsionando o aprimoramento dessa técnica (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010).

Além de separar os analitos presentes na amostra de interesse, é importante realizar a quantificação dos mesmos e para isso é necessário a presença de um

detector, que mede as mudanças de concentração ou a massa dos compostos da amostra que está deixando a coluna cromatográfica. Até o presente momento, não existe para CLAE um detector universal, porém dentre os que podem ser utilizados estão os eletroquímicos, fluorescência, índice de refração, espalhamento de luz, DAD ou UV-Visível e o espectrômetro de massas (CIOLA, 1998; JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006; MENDHAM *et al.*, 2008).

2.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

A espectrometria de massas é uma técnica analítica em que átomos ou moléculas de uma amostra são ionizados, positiva ou negativamente, e separados de acordo com a movimentação através de um campo elétrico ou magnético, pela sua razão massa/carga (m/z) (BARKER; ANDO, 1999).

Para se realizar essa técnica é necessário o uso de um espectrômetro de massas, que possui três componentes principais: a fonte de ionização, o analisador de massas e um detector (GLISH; VACHET, 2003; MORAES; LAGO, 2003), conforme representado na Figura 5.

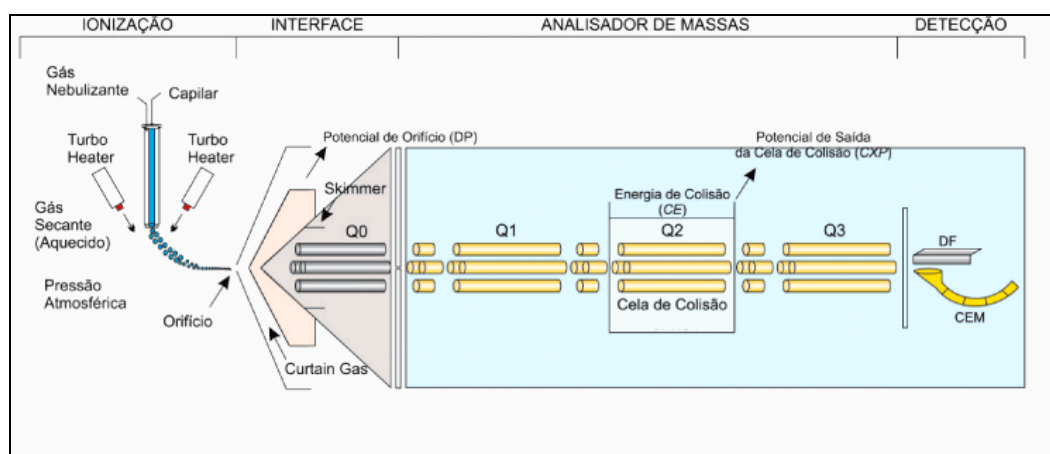


FIGURA 5 – ESQUEMA DE UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS EQUIPADO COM FONTE DE IONIZAÇÃO *ELECTROSPRAY*, ANALISADOR TRIPLO QUADRUPOLO E DETECTOR MULTIPLICADOR DE ELÉTRONS.

FONTE: Reproduzido e adaptado de MARTINS JUNIOR *et al.*, 2006

Nos últimos anos tem sido crescente a utilização da espectrometria de massas nas mais diversas áreas da ciência, como a biológica, ambiental, alimentos

e farmacêutica. Entretanto, foi o acoplamento da cromatografia líquida à espectrometria de massas que ganhou importância na indústria farmacêutica, pois associa a eficiência da separação cromatográfica com a sensibilidade e especificidade da espectrometria de massas, sendo útil tanto na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos quanto no controle de qualidade (PEREIRA *et al.*, 2005; CROTTI *et al.*, 2006; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Esse acoplamento só foi possível a partir do desenvolvimento de interfaces e fontes de ionização compatíveis tanto com a vazão do eluente da coluna cromatográfica quanto com as características de baixa volatilidade e instabilidade térmica dos compostos separados pela cromatografia líquida. Dentre essas fontes destacam-se as de ionização a pressão atmosférica, tais como a de ionização por eletronebulização, também conhecida por *electrospray* (ESI) e a de ionização química a pressão atmosférica (APCI) (PEREIRA *et al.*, 2005; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Em 1984, Masamichi Yamashita e John Fenn demonstraram a aplicabilidade do ESI, e desde então essa técnica de ionização tem sido considerada uma das mais importantes e utilizadas (YAMASHITA; FENN, 1984). No ESI o eluente que sai da coluna cromatográfica passa por um capilar, ao qual se aplica uma alta voltagem, resultando na formação de gotículas eletricamente carregadas, que são posteriormente dessolvatadas, resultando em íons que são conduzidos ao analisador de massas (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009), conforme ilustrado na Figura 6.

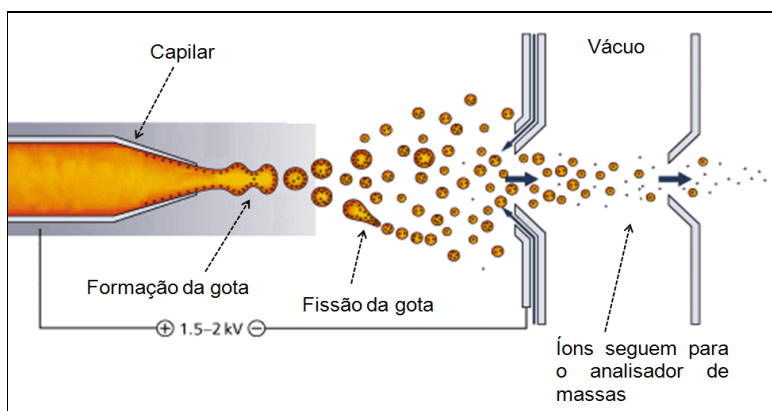


FIGURA 6 – ESQUEMA DE IONIZAÇÃO POR *ELECTROSPRAY*
FONTE: Reproduzido e adaptado de RSC, 2003

No APCI enquanto o aquecimento vaporiza o eluente da coluna cromatográfica, uma descarga corona ioniza as moléculas do solvente que, através de uma série de reações químicas, promovem a ionização do analito (GLISH; VACHET, 2003; KORFMACHER, 2005), conforme ilustrado na Figura 7.

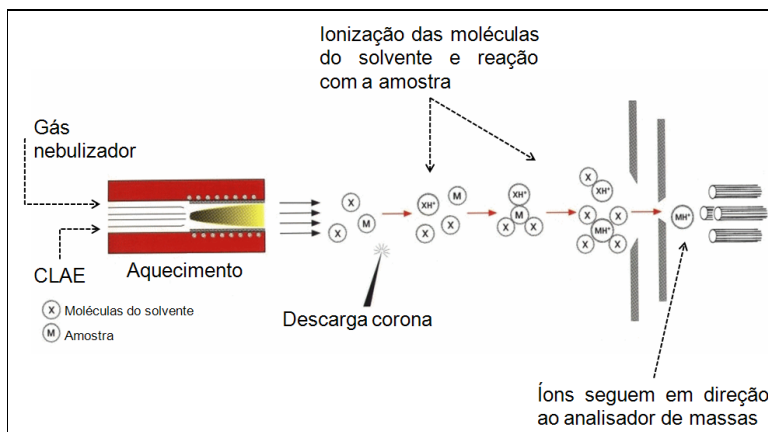


FIGURA 7 – ESQUEMA DE IONIZAÇÃO POR APCI
 FONTE: Reproduzido e adaptado de USC, 2011

Uma vez tenha ocorrido a produção de íons, esses precisam ser separados de acordo com a sua respectiva m/z e, portanto necessitam atravessar o analisador de massas, que se divide em dois principais grupos: os de transmissão e os de captura. Nos analisadores de transmissão, os íons deixam a fonte de ionização e atravessam um campo eletromagnético até chegar ao detector. Já nos analisadores de captura, os íons são armazenados no analisador através de um campo eletromagnético, no qual podem ser avaliados ou injetados para outra fonte externa de íons (GLISH; VACHET, 2003).

Dentre os analisadores de captura destacam-se o de tempo de voo (TOF), captura de íons (íon trap) e ressonância ciclotrônica de íons (ICR). Os analisadores TOF apresentam alta resolução, precisão e sensibilidade, sendo capazes de identificar altas faixas de massa, muito útil para análise de biomoléculas. O íon trap associa o baixo custo, com a facilidade de uso e a sensibilidade. Já o ICR, apesar das vantagens da alta resolução, precisão e exatidão, ainda apresenta como principal desvantagem o custo elevado (GLISH; VACHET, 2003; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

Em relação aos analisadores de transmissão, o mais popular é o quadrupolo, que consiste de quatro cilindros metálicos paralelos, nos quais se aplicam uma

corrente elétrica (DC) e um potencial de rádio frequência (rf) alternante. A separação de massa é resultado do movimento do íon em um campo elétrico dinâmico e depende diretamente da m/z do íon, visto que somente o íon de m/z específica terá uma trajetória estável e chegará ao detector (Figura 8). As principais vantagens desse analisador são o baixo custo, robustez e facilidade de manutenção. Entretanto, diferentemente do TOF, possui como limitação a análise de compostos com massa de até 4000 Da (GLISH; VACHET, 2003; EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

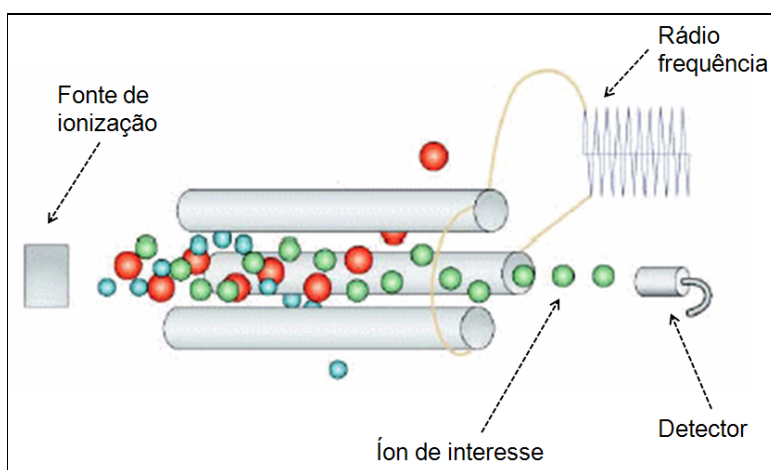


FIGURA 8 – ESQUEMA DE UM QUADRUPOLO
FONTE: Reproduzido e adaptado de GLISH; VACHET, 2003

Outro exemplo de analisador de transmissão é o triplo quadrupolo, composto por uma sequência de três quadrupolos, onde o primeiro e o terceiro operam como espectrômetros de massa e o segundo como câmera de colisão, aonde os íons fragmentos são formados (GLISH; VACHET, 2003; KORFMACHER, 2005). A grande vantagem de seu uso é o da análise sequencial, também conhecida como espectrometria de massas sequencial (EM-EM), que além de favorecer a elucidação estrutural da molécula oferece especificidade, uma vez que os íons fragmentos formados são característicos para cada composto (DOOLEY, 2003; EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

Os íons provenientes do analisador chegam finalmente ao detector, aonde ocorre a detecção e amplificação dos mesmos. Existem diversos tipos de detectores disponíveis no mercado, como o Faraday Cup e os multiplicadores de fótons,

contudo os multiplicadores de elétrons estão entre os mais utilizados atualmente, pois oferecem boa resposta e sensibilidade (BARKER; ANDO, 1999).

2.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A legislação da indústria veterinária tem passado por freqüentes mudanças, aumentando as exigências com relação à fabricação de produtos de uso veterinário. O Decreto-Lei nº 467, de 13 de fevereiro de 1969 define produto veterinário como:

Todos os preparados de fórmula simples ou complexa, de natureza química, farmacêutica, biológica ou mista, com propriedades definidas e destinadas a prevenir, diagnosticar ou curar doenças dos animais, ou que possam contribuir para a manutenção da higiene animal. (BRASIL, 1969).

A Instrução Normativa nº 13, de 03 de outubro de 2003, aprova o Regulamento de Boas Práticas de Fabricação de Produtos de Uso Veterinário, considerando que o fabricante é responsável pela identidade, pureza e segurança dos produtos, devendo possuir laboratórios de controle de qualidade adequados para realização dos ensaios necessários (BRASIL, 2003b).

Para produto veterinário farmacêutico, o Decreto nº 5053, de 22 de abril de 2004, exige que para cada lote produzido seja elaborado um protocolo de produção, aonde deverá constar os resultados obtidos nas análises de qualidade de acordo com as farmacopéias ou técnica analítica apresentada pelo fabricante, indicando os parâmetros dos limites de tolerância e dos desvios para as análises e dosagens dos princípios ativos da formulação (BRASIL, 2004).

Para complementar as legislações citadas anteriormente foi publicado o Ato nº10, de 16 de setembro de 2005, que descreve o Roteiro para Inspeção de Boas Práticas de Fabricação de Produtos Veterinários de Natureza Farmacêutica (BRASIL, 2005b).

Tendo em vista o caráter farmacêutico dos produtos, o Conselho Federal de Farmácia (CFF) elaborou a Resolução nº 504, de 29 de maio de 2009, que regulamenta as atividades do farmacêutico na indústria de produtos veterinários de natureza farmacêutica, afirmando que é competência do profissional farmacêutico

todo o processo de produção do medicamento bem como a elaboração e validação dos métodos analíticos utilizados (BRASIL, 2009).

A validação de métodos analíticos consiste em um processo pelo qual estudos estatísticos são utilizados com a finalidade de garantir que o método avaliado atende às exigências desejadas, comprovando que é adequado e confiável para o qual é proposto (GIL; BATISTA FILHO, 2007).

Além dos equipamentos e utensílios estarem previamente calibrados, deve-se definir os parâmetros para a validação do ensaio analítico, sendo que os mais importantes são a seletividade, linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade e robustez (GIL; BATISTA FILHO, 2007).

Os testes que podem ser necessários são classificados em quatro categorias conforme sua finalidade, como demonstrado na Tabela 6 (BRASIL, 2003a).

TABELA 6 – CLASSIFICAÇÃO DOS TESTES SEGUNDO SUA FINALIDADE

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

FONTE: BRASIL, 2003a.

Ainda, cada categoria de testes exige uma série de ensaios, conforme segue na Tabela 7 (BRASIL, 2003a).

TABELA 7 - ENSAIOS NECESSÁRIOS PARA A VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO SEGUNDO SUA FINALIDADE

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

FONTE: BRASIL, 2003a.

2.8.1 Especificidade/Seletividade

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método analítico. Consiste na capacidade que um método possui de avaliar, de forma inequívoca, determinadas substâncias na presença de componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz, que possam interferir na sua determinação (RIBANI *et al.*, 2004).

Os termos seletividade e especificidade têm sido definidos com o mesmo significado, porém deve-se utilizar apenas o termo seletividade como sugerido pela International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (VESSMAN, 1996). O Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial do Brasil (INMETRO), infere que um método de separação que causa resposta para uma única substância de interesse pode ser chamado específico e um método que produz resposta para vários compostos químicos com uma característica em comum, mas que pode distinguir a resposta entre eles, pode ser chamado de seletivo, como no caso de métodos cromatográficos (INMETRO, 2003).

Para análises quantitativas e de impurezas, a avaliação da seletividade de um método pode ser estabelecida através da comparação dos resultados obtidos de amostras contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes

e amostras não contaminadas, demonstrando que os resultados não são afetados por esses materiais. Outra forma de avaliação que pode ser realizada, quando da ausência das impurezas ou padrão de degradação, é a comparação dos resultados obtidos através das amostras com um segundo método bem caracterizado como, por exemplo, uma metodologia farmacopéica. No entanto essas comparações devem incluir amostras armazenadas sob condições de estresse (luz, calor, umidade, hidrólise e oxidação) (BRASIL, 2003a).

Para métodos cromatográficos, outro procedimento para avaliar a seletividade é a verificação da pureza dos picos cromatográficos através da utilização de outra técnica analítica. Após a coleta da substância de interesse, métodos específicos para avaliação de estrutura molecular como espectrometria de massas, ressonância nuclear magnética e espectroscopia no infravermelho, garantem que não há interferências na determinação do composto de interesse frente à presença de outros componentes em uma dada matriz (JENKE, 1998; BRASIL, 2003a).

2.8.2 Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) é a menor concentração de analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições estabelecidas experimentalmente e é de extrema importância para análise de traços (BRASIL, 2003a; INMETRO, 2003).

Para métodos instrumentais que demonstram o ruído da linha de base, como cromatografia líquida de alta eficiência, a determinação do LD é realizada através da relação sinal-ruído, de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (BRASIL, 2003a). A estimativa para o LD pode ser determinado com base na relação de três vezes o ruído da linha de base ou pela fórmula:

$$LD = \frac{DPa}{IC} \times 3$$

Onde DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de no mínimo três curvas de calibração construídas contendo a concentração do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio também pode ser obtido a partir da análise de um número apropriado de amostras do branco. O IC é a inclinação da curva (BRASIL, 2003a; ICH, 2005).

2.8.3 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exatidão sob as condições experimentais estabelecidas.

Assim como para o limite de detecção, a determinação do LQ é realizada através da relação sinal-ruído, de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível quantificável (BRASIL, 2003a). A estimativa para o LQ pode ser determinado com base na relação de dez vezes o ruído da linha de base ou pela fórmula:

$$LQ = \frac{DPa}{IC} \times 10$$

Onde DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de no mínimo três curvas de calibração construídas contendo a concentração do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio também pode ser obtido a partir da análise de um número apropriado de amostras do branco. O IC é a inclinação da curva (BRASIL, 2003a; ICH, 2005).

2.8.4 Linearidade

Esse parâmetro avalia a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003a; ICH, 2005).

No mínimo cinco concentrações diferentes, contemplando 80 a 120% da concentração teórica do teste, devem ser avaliadas por inspeção visual de uma representação gráfica. Se visualizado uma relação linear aparente entre os dados, esses devem ser avaliados por métodos estatísticos apropriados, ou seja, determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Entretanto se não houver relação linear, deve-se usar como ferramenta a transformação matemática (BRASIL, 2003a; USP, 2008).

2.8.5 Intervalo

O intervalo é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É validado através da verificação de que o método analítico apresenta exatidão, precisão e linearidade aceitáveis quando aplicado a amostras contendo quantidades de analitos dentro do intervalo especificado (BRASIL, 2003a; USP, 2008).

Diferentes intervalos podem ser especificados de acordo com o tipo de ensaio a ser realizado, como descrito na Tabela 8.

TABELA 8 - LIMITES PORCENTUAIS DO TEOR DO ANALITO QUE DEVEM ESTAR CONTIDOS NO INTERVALO DE LINEARIDADE PARA ALGUNS MÉTODOS ANALÍTICOS

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir -20% sobre o menor valor e $+20\%$ sobre o maior valor.

FONTE: BRASIL, 2003a.

2.8.6 Precisão

A precisão de um método analítico é o grau de concordância entre os resultados dos testes individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente para amostragens múltiplas de uma amostra homogênea. Esse parâmetro é geralmente expresso através do desvio padrão (DP) ou desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV%), de um número suficiente de amostras (BRASIL, 2003a; USP, 2008). O cálculo do DPR ou CV% é realizado através da seguinte fórmula:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP (desvio padrão)}}{\text{Concentração média determinada}} \times 100$$

O valor máximo aceitável é definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, tipo de matriz e a finalidade do método, não sendo admitidos valores superiores a 5% (BRASIL, 2003a).

A precisão pode ser considerada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

2.8.6.1 Repetitividade

A repetitividade, conhecida como precisão intracorrída, expressa o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra, efetuadas sob um mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento em condições idênticas de uso, mesmo local e repetições em curto período de tempo (BRASIL, 2003a; INMETRO, 2003).

De acordo com as Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos (DOQ-CGCRE) do INMETRO, são necessárias sete ou mais repetições para o cálculo do desvio padrão, em várias concentrações do intervalo de trabalho. Já a ANVISA e o ICH preconizam o mínimo de nove determinações, contemplando três concentrações (baixa, média e alta) com triplicatas ou seis determinações a 100% da concentração do teste (BRASIL, 2003a; INMETRO, 2003; ICH, 2005).

2.8.6.2 Precisão Intermediária

A precisão intermediária, conhecida como precisão intercorrida, expressa o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra, efetuadas sob um mesmo procedimento de medição, porém com diferentes analistas, dias diferentes ou ainda equipamentos diferentes (BRASIL, 2003a; INMETRO, 2003). Em resumo pode-se afirmar que é a concordância entre os resultados de um mesmo laboratório por meio da utilização um mesmo método analítico (BRASIL, 2003a).

2.8.6.3 Reprodutibilidade

Reprodutibilidade ou precisão inter-laboratorial, é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, obtidas sob condições variadas de medição (INMETRO, 2003). Em geral é aplicada como forma de colaboração entre laboratórios, de modo a verificar o desempenho dos métodos e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopéias. Havendo comprovação da reprodutibilidade em ensaios de validação, não é necessária a comprovação da precisão intermediária (BRASIL, 2003a).

2.8.7 Exatidão

A exatidão de um método analítico é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro (BRASIL, 2003a; INMETRO, 2003). É determinada após o estabelecimento da linearidade, precisão e seletividade, com no mínimo nove determinações (três réplicas) para cada faixa de concentração (baixa, média e alta) (BRASIL, 2003a; ICH, 2005). A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média

determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental} \times 100}{\text{Concentração teórica}}$$

A exatidão pode ser determinada pela aplicação do método analítico a um padrão de referência ou pela comparação dos resultados obtidos com o método em questão a um segundo método já validado (BRASIL, 2003a).

Para determinação da exatidão várias metodologias estão disponíveis:

a) Fármaco

Aplicação do método em questão na análise de um padrão de referência ou comparação dos resultados obtidos com uma segunda metodologia validada (BRASIL, 2003a).

b) Forma Farmacêutica

Análise de uma amostra a qual foi adicionada quantidade conhecida de fármaco a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado) ou, na falta desses, pela adição do padrão de referência ao medicamento (BRASIL, 2003a).

c) Impurezas

Análise pelo método de adição de padrão, no qual se adiciona quantidades conhecidas de impurezas e/ou produtos de degradação ao medicamento ou fármaco, ou ainda, na indisponibilidade das amostras de impurezas, a comparação dos resultados obtidos pelo método em questão com um segundo método validado (BRASIL, 2003a).

2.8.8 Robustez

Esse parâmetro se refere a capacidade de um método analítico em resistir a pequenas, mas deliberadas, variações (BRASIL, 2003a).

Entre os fatores investigados destacam-se temperatura, pH, grau de pureza de reagentes, composição de fase móvel e velocidade de fluxo (BRASIL, 2003a). Esses fatores podem variar de acordo com o método a ser avaliado, conforme mostra a Tabela 9.

TABELA 9 - FATORES QUE DEVEM SER CONSIDERADOS NA DETERMINAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO ANALÍTICO

Preparo das Amostras	<ul style="list-style-type: none"> ·Estabilidade das soluções analíticas ·Tempo de extração
Espectrofotometria	<ul style="list-style-type: none"> ·Variação do pH da solução ·Temperatura
Cromatografia Líquida	<ul style="list-style-type: none"> ·Variação do pH da fase móvel ·Variação na composição da fase móvel ·Diferentes lotes ou fabricantes de colunas ·Temperatura ·Fluxo da fase móvel
Cromatografia Gasosa	<ul style="list-style-type: none"> ·Diferentes lotes ou fabricantes de colunas ·Temperatura ·Velocidade do gás de arraste

FONTE: BRASIL, 2003a

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Amostras comerciais de associação de antiparasitários de uso veterinário

Amostras comerciais de comprimidos contendo ivermectina e associação de ivermectina, febantel, praziquantel e pamoato de pirantel foram obtidas no comércio local de Curitiba-PR, sendo sua composição, registro, teor declarado de ativo e datas de fabricação e validade descritos no Quadro 1. Os nomes dos fabricantes e o número de registro no Ministério da Agricultura e da Saúde não foram divulgados por questões éticas.

Amostra	Registro	Fabricação e Validade	Composição	Teor declarado por comprimido (mg)
1	Ministério da Saúde	02.11/01.13	Ivermectina	6,0
2	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento	10.09/10.11	Ivermectina Febantel Praziquantel Pamoato de pirantel	0,060 150,0 50,0 144,0
3	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento	06.10/06.12	Ivermectina Febantel Praziquantel Pamoato de pirantel	0,060 150,0 50,0 144,0
4	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento	05.11/05.13	Ivermectina Febantel Praziquantel Pamoato de pirantel	0,060 150,0 50,0 144,0

QUADRO 1 – DESCRIÇÃO DO REGISTRO, DATA DE FABRICAÇÃO E VALIDADE, COMPOSIÇÃO E TEOR DE ATIVO (S) DECLARADO NAS AMOSTRAS DE COMPRIMIDOS CONTENDO ANTIPARASITÁRIOS

3.1.2 Substâncias químicas de referência

As substâncias de referência utilizadas nesta dissertação estão relacionadas na Tabela 10, com a descrição do peso molecular, teor e marca. Como padrões internos foram utilizados albendazol e eprinomectina, cujas fórmulas estruturais estão representadas na Figura 9.

TABELA 10 – DESCRIÇÃO DO PESO MOLECULAR, TEOR E MARCA DAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Analito	Peso molecular (g.mol ⁻¹)	Teor (%)	Marca
Ivermectina	H2B1a - 875 H2B1b - 861	H2B1a - 89,7 H2B1b - 0,90	USP
Febantel	446,48	99,6	Sigma
Pamoato de Pirantel	594,68	96,7	Sigma
Praziquantel	312,41	99,7	Sigma
Impureza C do Febantel	299,35	99,5	Sigma
Impureza A do Pirantel	594,68	98,0	USP
Impureza A do Praziquantel	306,37	99,0	USP
Impureza B do Praziquantel	310,40	98,0	USP
Impureza C do Praziquantel	342,39	100,0	USP
Albendazol	265,32	99,6	USP
Eprinomectina	B1a – 914,13 B1b – 900,10	B1a - 92,5 B1b - 7,5	Dr. Ehrenstorfer

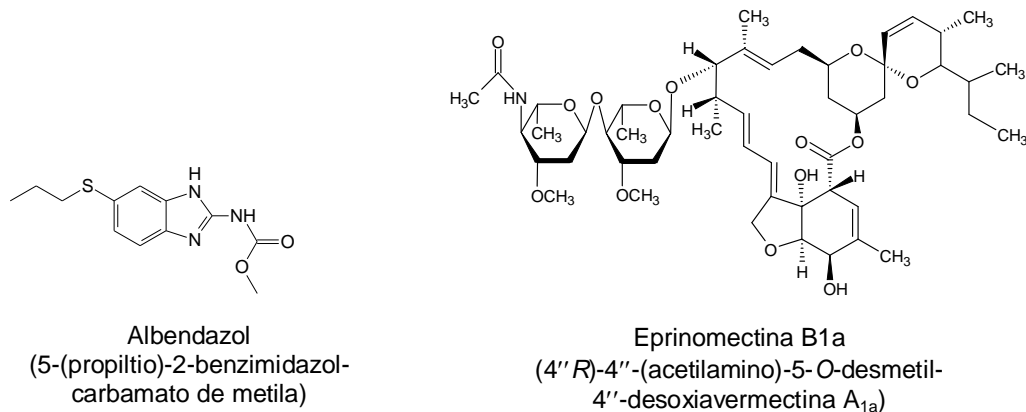


FIGURA 9 – FÓRMULAS ESTRUTURAIS DOS PADRÕES INTERNOS ALBENDAZOL E EPRINOMECTINA (B1a)
FONTE: USP, 2008

3.1.3 Excipientes, reagentes e solventes

- Excipientes: ácido cítrico, amido de milho e talco da Pharma Nostra (Rio de Janeiro, Brasil); celulose microcristalina, fosfato de cálcio dibásico e metionina da Deg (São Paulo, Brasil); lactose e laurilsulfato de sódio da Via Farma (São Paulo, Brasil), dióxido de silício coloidal da Genix (Anápolis, Brasil); estearato de magnésio da Valdequímica (São Paulo, SP); glicolato sódico de amido da Embrafarma (São Paulo, Brasil); butil-hidroxitolueno da Pharmaspecial (Santana de Parnaíba, Brasil) e povidona K 25 da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).
- Reagentes e solventes: acetato de amônio, acetato de etila, ácido fórmico (88%, v/v), hexano e tolueno da J. T. Baker (New Jersey, EUA), acetona P.A, ácido acético glacial P.A da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), acetonitrila e metanol grau CLAE (Tédia, Fairfield, USA), clorofórmio, dimetilsulfóxido e éter etílico P.A da Synth (São Paulo, Brasil), etanol 95% e hidróxido de amônio (28%, p/p) da FMaia (São Paulo, Brasil), formiato de amônio ($\geq 97\%$) da Acros Orgânicos (New Jersey, USA) e éter metil-t-butílico da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). Água ultrapura foi obtida através do sistema Milli-Q (Millipore, Milford, EUA).

3.1.4 Equipamentos e consumíveis

- Agitador de amostras Mixer Glas-Col (Terre Haute, EUA);
- Balança analítica Mettler Toledo, modelo Excellence Plus XP 205, com precisão de 0,01 mg (Columbus, EUA);
- Banho de ultrassom Branson 2510 (Danbury, EUA);
- Centrífuga refrigerada Eppendorf, modelo 5810-R (Hamburg, Alemanha);
- Concentrador de amostras Centrivap, Labconco (Kansas City, EUA);

- Cromatógrafo da Agilent, modelo 1200 equipado com bomba binária G1312B, degaseificador G1379B (Wilmington, EUA) e injetor automático CTC Waters 2777 Sample Manager (Milford, EUA);
- Espectrômetro de massas triplo quadrupolo da Applied Biosystems, modelo API 3200 (Toronto, Canadá) equipado com bomba de infusão Havard 22 Apparatus (South Natick, EUA) e interface *electrospray* (ESI). Os dados foram processados utilizando o software Analyst, versão 1.4, (ABI/Sciex);
- Gerador de nitrogênio PEAK Scientific Instruments (Chicago, EUA)
- Manifold Waters (Milford, EUA);
- Purificador de água Milli-Q- Millipore, A10 Gradiente (Milford, EUA);
- Vortex, Genie 2 (Bohemia, EUA).
- Cartucho para extração em fase sólida 1 mL/30 mg Oasis HLB, Waters (Milford, EUA);
- Cartucho para extração em fase sólida 1 mL/30 mg Oasis MCX, Waters (Milford, EUA);
- Coluna XBridge C₁₈ (100 x 2,1 mm; 5 µm), Waters (Milford, EUA);
- Coluna a XBridge C₁₈ (50 x 2,1 mm; 5 µm), Waters (Milford, EUA);
- Coluna XBridge C₈ (50 x 2,1 mm; 5 µm), Waters (Milford, EUA);
- Filtro de membrana Millipore Millex PVDF 0,22 e 0,45 µm de poro (Billerica, EUA);
- Papel de filtro quantitativo Quanty, JP 41, faixa preta, 12,5 cm de diâmetro e 28 µm de poro, J Prolab (São José dos Pinhais, Brasil);
- Pré-coluna XBridge C₁₈ (10 x 2,1 mm; 5 µm), Waters (Milford, EUA);
- Pré-coluna XBridge C₈ (10 x 2,1 mm; 5 µm), Waters (Milford, EUA);
- Tubo para centrifugação tipo Falcon, Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Suíça);

3.2 ESTUDO DA SOLUBILIDADE DOS FÁRMACOS

A solubilidade da ivermectina, febantel, praziquantel e pamoato de pirantel foi avaliada utilizando solventes de diferentes polaridades, sendo eles acetato de

etila, acetonitrila, água, clorofórmio, dimetilsulfóxido, etanol, éter etílico, hexano, metanol, éter metil-t-butilico e tolueno.

Para condução do ensaio 20 mg de cada fármaco foram quantitativamente transferidos para erlenmeyer de 250 mL, e em seguida alíquotas de cada solvente foram sucessivamente adicionadas até completa solubilização da substância. Os ensaios foram realizados individualmente para cada fármaco, sob agitação manual e solvente à temperatura ambiente. A solubilidade foi expressa de acordo com os termos descritivos da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2005a), conforme apresentado na Tabela 11.

TABELA 11 - FAIXA DE SOLUBILIDADE DE UMA SUBSTÂNCIA EM UM DETERMINADO VOLUME DE SOLVENTE

Para 20 mg de fármaco	
Quantidade de solvente	Faixa de solubilidade
20 µL	Muito solúvel
20 a 200 µL	Facilmente solúvel
200 a 600 µL	Solúvel
600 a 2000 µL	Ligeiramente solúvel
2 a 20 mL	Pouco solúvel
20 a 200 mL	Muito pouco solúvel
Acima de 200 mL	Praticamente insolúvel ou insolúvel

FONTE: Adaptado de BRASIL, 2005a

A fim de avaliar a possibilidade de utilizar um único diluente capaz de solubilizar todas as substâncias, diferentes proporções de acetonitrila com dimetilsulfóxido ou metanol também foram testadas (Tabela 12). Para cada fármaco, soluções foram preparadas de modo a obter uma concentração de 1 mg.mL^{-1} . As amostras foram submetidas ao banho de ultrassom por 10 min, e em seguida mantidas em repouso por 2 horas à temperatura ambiente. Cada fármaco foi avaliado individualmente. Como solução diluente foi considerada a mistura de solventes que promoveu a completa solubilização de todos os fármacos.

TABELA 12 – MISTURA DE SOLVENTES UTILIZADAS PARA O ESTUDO DE SOLUBILIDADE DA IVERMECTINA, FEBANTEL, PRAZIQUANTEL E PAMOATO DE PIRANTEL

Mistura de solventes	Proporções (v/v)
Dimetilsufóxido:Acetonitrila	2,5:97,5
	5:95
	10:90
	30:70
Metanol:Acetonitrila	40:60
	50:50

NOTA: Concentração das soluções 1 mg.mL^{-1}

3.3 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM/EM

3.3.1 Preparo da fase móvel

Foram preparadas duas soluções distintas para compor a fase móvel:

Solução A: solução aquosa de 0,1% de ácido fórmico e 3 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio.

Solução B: acetonitrila/água (95:5 v/v), contendo 0,1% de ácido fórmico e 3 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio.

Por fim, a fase móvel consistiu em uma mistura 10:90 v/v da solução A e solução B.

3.3.2 Preparo das soluções estoque

Para obtenção das soluções estoque, as substâncias químicas de referência foram pesadas em balança analítica e em seguida, dissolvidas separadamente com acetonitrila/metanol 50:50 v/v. Todos os analitos foram preparados em uma concentração de 1,0 mg.mL⁻¹, exceto a impureza C do febantel e o albendazol, que foram preparados a 0,2 mg.mL⁻¹ em função da solubilidade. As soluções foram estocadas ao abrigo da luz através de frascos âmbar e em refrigerador a 4°C.

3.3.3 Preparo das soluções diluentes

A solução diluente utilizada para o preparo das soluções de trabalho e amostras foi a mesma da fase móvel (seção 3.3.1).

3.3.4 Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas

A checagem do sinal dos analitos foi realizada através de análise por infusão direta no espectrômetro de massas. Para realização deste experimento soluções de trabalho foram preparadas em diferentes concentrações utilizando como diluente uma mistura 10:90 v/v de água e acetonitrila/água (95:5 v/v), variando a concentração dos aditivos (Tabela 13). Cada solução foi infundida ($10 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$) na interface *electrospray* operando no modo positivo de ionização. A posição do capilar foi mantida em 10 mm na vertical e 5 mm na horizontal.

TABELA 13 – DIFERENTES PROPORÇÕES DE ADITIVOS UTILIZADOS PARA CHECAGEM DE SINAL DOS ANALITOS

Aditivos	Concentrações
Ácido acético e acetato de amônio	1% e $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
	1% e $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
Ácido fórmico e acetato de amônio	1% e $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
	1% e $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
	1% e $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
Ácido fórmico e formiato de amônio	1% e $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
	1% e $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
	1% e $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
	0,1% e $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

Selecionada a concentração de aditivos que promoveu uma adequada intensidade de sinal dos analitos, a próxima etapa foi a realização do experimento de *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Para tanto a concentração dos analitos foi variada a fim de obter uma intensidade de sinal entre 2×10^5 a 1×10^6 cps. Após a otimização automática dos parâmetros de *declustering potencial* (DP), *entrance potencial* (EP), *collision cell entrance potencial* (CEP), *collision energy* (CE) e *cell exit potencial* (CXP), foram obtidos dois íons fragmentos de cada analito.

A próxima etapa de otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas foi a análise por injeção em fluxo (FIA). Essa etapa consistiu no acoplamento do cromatógrafo ao espectrômetro de massas para otimização dos seguintes parâmetros: *curtain gas* (CUR), *collisionally activated dissociation* (CAD), *nebulizer gas* (GS1), *turbo gas* (GS2), *ion spray voltage* (IS) e temperatura da fonte. As análises foram realizadas sem coluna utilizando como fase móvel uma mistura 50:50 v/v de solução A e solução B (seção 3.3.1, pág. 73). O fluxo foi mantido em

200 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ e a posição do capilar em 3 mm na vertical e 5 mm na horizontal. O volume de injeção foi de 20 μL .

Todos os ensaios foram conduzidos utilizando uma solução de trabalho contendo uma mistura de 25 $\text{ng}.\text{mL}^{-1}$ de pamoato de pirantel, 300 $\text{ng}.\text{mL}^{-1}$ de eprinomectina, 600 $\text{ng}.\text{mL}^{-1}$ de ivermectina e 100 $\text{ng}.\text{mL}^{-1}$ de febantel, praziquantel, albendazol, impureza C do febantel e impurezas A, B e C do praziquantel.

3.3.5 Otimização da cromatografia

A otimização cromatográfica foi realizada utilizando três colunas XBridge: C18 (100 x 2,1 mm, 5 μm), C18 (50 x 2,1 mm, 5 μm) e C8 (50 x 2,1 mm, 5 μm). Diferentes proporções de água e acetonitrila/água (95:5 v/v) foram avaliadas para compor a fase móvel, mantendo como aditivos 0,1% de ácido fórmico e 3 $\text{mmol}.\text{L}^{-1}$ de formiato de amônio. O fluxo foi mantido em 200 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ e a temperatura em 20°C.

Os ensaios foram conduzidos utilizando uma solução de trabalho contendo uma mistura de 25 $\text{ng}.\text{mL}^{-1}$ de pamoato de pirantel, 300 $\text{ng}.\text{mL}^{-1}$ de eprinomectina, 600 $\text{ng}.\text{mL}^{-1}$ de ivermectina e 100 $\text{ng}.\text{mL}^{-1}$ de febantel, praziquantel, albendazol, impureza C do febantel e impurezas A, B e C do praziquantel. A seleção do sistema cromatográfico foi baseada nos resultados de melhor perfil cromatográfico com base nos parâmetros do espectrômetro de massas. A velocidade de aquisição dos dados (*Dwell time*) foi calculada em função do número de íons monitorados.

3.3.6 Teste de *carry over*

O ensaio de *carry over* foi conduzido através da injeção de uma solução de trabalho contendo os fármacos e padrões internos, seguida pela injeção de um branco. Foram avaliadas duas misturas de solventes para limpeza da seringa do injetor automático, sendo eles acetonitrila/metanol (50:50 v/v) e água/metanol (50:50 v/v).

Para realização desse ensaio foi preparada uma solução contendo 20 ng.mL⁻¹ de albendazol, 30 ng.mL⁻¹ de praziquantel, 50 ng.mL⁻¹ de eprinomectina, 200 ng.mL⁻¹ de ivermectina e 100 ng.mL⁻¹ de febantel e pamoato de pirantel, correspondendo ao ponto mais alto da curva de calibração (seção 3.4.3, pág. 79). Foi utilizado como diluente a fase móvel estabelecida (seção 3.3.1, pág. 73). O branco consistiu nesse mesmo diluente, porém sem os fármacos e padrões internos. A solução de trabalho foi filtrada em filtro de PVDF 0,22 µm antes da análise.

O critério de escolha para a solução de limpeza foi baseado na capacidade de redução dos efeitos de *carry over* entre as amostras.

3.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM/EM

Após a otimização do método, este foi por fim validado segundo os critérios descritos na Resolução – RE nº 899, de 29 de março de 2003, ANVISA, categoria I que dispõe sobre testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas (BRASIL, 2003a).

3.4.1 Seletividade

O parâmetro seletividade foi avaliado através do método da comparação da matriz. Para isso cinco diferentes placebos (A, B, C, D e E) foram manipulados com excipientes comumente utilizados para o preparo de comprimidos. Os placebos continham as seguintes composições:

- Placebo A: ácido cítrico (1%), estearato de magnésio (2%), laurilsulfato de sódio (2%), dióxido de silício coloidal (5%), fosfato de cálcio dibásico (5%), povidona K 25 (5%), talco (5%), amido de milho (30%) e celulose microcristalina (45%).

- Placebo B: metionina (0,1%), ácido cítrico (1%), estearato de magnésio (2%), lauril sulfato de sódio (2%), dióxido de silício coloidal (5%), fosfato de cálcio dibásico (5%), povidona K 25 (5%), talco (5%), amido de milho (30%) e celulose microcristalina (44,9%).
- Placebo C: dióxido de silício coloidal (1%), amido de milho (24,75%) e celulose microcristalina (74,25%).
- Placebo D: dióxido de silício coloidal (0,8%), lauril sulfato de sódio (2%), glicolato sódico de amido (8%), celulose microcristalina (22,3%) e lactose (66,9%).
- Placebo E: butil-hidroxitolueno (0,05%), dióxido de silício coloidal (1%), lauril sulfato de sódio (1,5%), talco (10%), celulose microcristalina (30%) e amido de milho (57,45%).

Cerca de 250 mg de cada placebo foram individualmente pesados e transferidos para balões volumétricos de 25 mL. Uma alíquota de 15 mL de acetonitrila/metanol 50:50 v/v foi adicionada a cada balão que, em seguida, foram submetidos a agitação mecânica (30 rpm) e sonicação por 10 minutos cada. O volume foi completado com o mesmo diluente e as amostras foram homogeneizadas e filtradas em papel de filtro quantitativo. Uma alíquota de 1 mL do filtrado foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, sendo o volume completado com a fase móvel estabelecida (seção 3.3.1, pág. 73).

Em uma segunda etapa foi preparada uma solução de trabalho contendo a seguinte mistura: 0,25 ng.mL⁻¹ de febantel, albendazol, impureza C do febantel e impureza A do praziquantel, 0,50 ng.mL⁻¹ de praziquantel, pamoato de pirantel e impureza B de praziquantel, 5,00 ng.mL⁻¹ de ivermectina, eprinomectina e impureza C de praziquantel.

Todas as amostras foram filtradas em filtro de PVDF 0,22 µm antes das análises por CLAE-EM/EM.

A seletividade foi avaliada comparando os cromatogramas dos placebos com o da mistura dos padrões analíticos. Nenhum pico de interferência significativa

deve ser observado no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse ou dos padrões internos.

3.4.2 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados a partir da relação sinal/ruído. Para tanto uma solução contendo 500 ng.mL^{-1} de cada analito foi diluída de forma seriada até o menor pico detectável. As diluições foram realizadas em triplicata usando como diluente a fase móvel estabelecida (seção 3.3.1, pág. 73).

O LD foi obtido através da menor concentração que resultou em um pico de três vezes o ruído da linha de base, e o LQ como a menor concentração a qual resultou em um sinal/ruído igual ou maior que dez.

3.4.3 Linearidade e intervalo

As curvas de calibração foram realizadas em triplicata em seis níveis de concentração. Para realização desse ensaio, soluções de trabalho foram preparadas e diluídas de modo a obter uma faixa de concentração de 20 a 100 ng.mL^{-1} de febantel e pamoato de pirantel, 6 a 30 ng.mL^{-1} de praziquantel, e 40 a 200 ng.mL^{-1} de ivermectina. Não foi estabelecida a linearidade das impurezas, visto que o limite máximo estabelecido é muito próximo do limite de quantificação. Portanto as impurezas foram avaliadas apenas qualitativamente. Todas as soluções foram filtradas em filtro de PVDF $0,22 \mu\text{m}$ antes das análises por CLAE-EM/EM. Detalhes do preparo das curvas de calibração são demonstrados na Tabela 14.

TABELA 14 - ESQUEMA DE DILUIÇÃO PARA O PREPARO DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS NO ENSAIO DE LINEARIDADE

Níveis de concentração	Volume da solução de trabalho 1 ^a (mL)	Volume da solução de trabalho 2 ^b (mL)	Volume final ^c (mL)	Concentração final (ng.mL ⁻¹)					
				FEB	PIR	PRA	IVE	ALB	EPR
1	0,20	0,50	10	20	20	6	40	20	50
2	0,40	0,50	10	40	40	12	80	20	50
3	0,50	0,50	10	50	50	15	100	20	50
4	0,60	0,50	10	60	60	18	120	20	50
5	0,80	0,50	10	80	80	24	160	20	50
6	1,00	0,50	10	100	100	30	200	20	50

NOTA: ^aSolução de trabalho 1: 1000 ng.mL⁻¹ de febantel (FEB) e pamoato de pirantel (PIR), 300 ng.mL⁻¹ de praziquantel (PRA) e 2000 ng.mL⁻¹ de ivermectina (IVE).

^bSolução de trabalho 2: 400 ng.mL⁻¹ de albendazol (ALB) e 1000 ng.mL⁻¹ de eprinomectina (EPR).

^cDiluyente: fase móvel estabelecida (seção 3.3.1, pág. 73).

As áreas registradas para cada analito e em cada nível de concentração foram submetidas à análise de regressão linear. Como critério de aceitação, o coeficiente de regressão deve ser superior a 0,99 e nenhum desvio maior que 15% nos valores de precisão e exatidão devem ser observados em cada nível de concentração (de acordo com as recomendações determinadas pelo fabricante do espectrômetro de massas). Além disso, para cada analito foi realizada a análise de variância (nível de 95%) a fim de avaliar o ajuste do modelo linear e a validade da regressão.

O intervalo de trabalho estabelecido foi de 80 a 120% da concentração teste (15 ng.mL⁻¹ de praziquantel, 100 ng.mL⁻¹ de ivermectina e 50 ng.mL⁻¹ de febantel e pamoato de pirantel).

3.4.4 Precisão

A precisão do método foi determinada em dois níveis: repetitividade (precisão intracorrida) e precisão intermediária (precisão intercorrida).

Para determinação da precisão, soluções de trabalho foram preparadas e diluídas contemplando um único nível de concentração para os padrões internos e três níveis de concentração para os fármacos, abrangendo 80, 100 e 120 % da concentração teste (Tabela 15).

O ensaio de repetitividade foi realizado em um mesmo equipamento, em um curto período de tempo por um mesmo analista. A precisão intermediária, por sua vez, foi determinada por um segundo analista, utilizando o mesmo equipamento e nos mesmos níveis de concentração da repetitividade, porém com um intervalo de dois dias. A dispersão dos resultados foi avaliada através do desvio padrão relativo e as ferramentas estatísticas Teste F e Teste t foram empregadas para comparação das médias obtidas para cada analito em cada ensaio.

TABELA 15 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO UTILIZADOS PARA O ENSAIO DE PRECISÃO

Analitos	Níveis de concentração (ng.mL ⁻¹)		
	1	2	3
Febantel	40	50	60
Pamoato de pirantel	40	50	60
Praziquantel	12	15	18
Ivermectina	80	100	120
Albendazol*	20	20	20
Eprinomectina*	50	50	50

NOTA: *Padrão interno. As amostras foram preparadas utilizando como diluente a fase móvel estabelecida (seção 3.3.1, pág. 73)

3.4.5 Exatidão

A exatidão foi determinada através do método da adição do padrão.

Para realização do ensaio teórico soluções de trabalho dos fármacos e dos padrões internos foram preparadas nos mesmos níveis de concentração do ensaio de precisão (Tabela 15) e submetidas ao CLAE-EM/EM, nas condições pré-determinadas, para a obtenção das áreas dos picos de cada analito, em cada nível de concentração. Essas áreas foram consideradas como teóricas.

Em uma segunda etapa, dez comprimidos da amostra 2 (seção 3.1.1, pág. 68) foram pulverizados e cerca de 172 mg do pó (equivalente ao valor teórico de 25 mg de febantel, 24 mg de pamoato de pirantel, 8,33 mg de praziquantel e 0,01 mg de ivermectina) foram exatamente pesados e transferidos para um balão volumétrico de 25 mL. Uma alíquota de 15 mL de acetonitrila/metanol 50:50 v/v foi adicionada ao balão que, em seguida, foi submetido a agitação mecânica (30 rpm) e

sonicação por 10 minutos cada. O volume foi completado com o mesmo diluente e a amostra foi homogeneizada e filtrada em papel de filtro quantitativo. O filtrado foi diluído 1:100000 v/v utilizando como diluente a fase móvel estabelecida (seção 3.3.1, pág. 73). Esse filtrado foi analisado por CLAE-EM/EM e as áreas dos picos obtidas para cada composto foram registradas. Posteriormente foi preparada uma nova solução com a amostra dos comprimidos, porém fortificada com soluções de trabalho (padrões) nos mesmos níveis de concentração do ensaio teórico. Os valores de áreas recuperadas foram calculados subtraindo as áreas obtidas das amostras sem fortificação, daquelas obtidas das amostras fortificadas.

A exatidão foi expressa como porcentagem da área recuperada de cada analito comparada com a área teórica. O intervalo de confiança no nível de 95% também foi considerado como critério para avaliação do parâmetro de exatidão.

3.4.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada considerando alguns parâmetros que poderiam afetar a resposta dos analitos e dos padrões internos. As amostras foram preparadas em sextuplicata na concentração de 50 ng.mL⁻¹ de febantel, eprinomectina e pamoato de pirantel, 15 ng.mL⁻¹ de praziquantel, 100 ng.mL⁻¹ de ivermectina e 20 ng.mL⁻¹ de albendazol. Utilizou-se como diluente a fase móvel estabelecida (seção 3.3.1, pág. 73). Os parâmetros modificados estão descritos na Tabela 16.

As ferramentas estatísticas Teste F e Teste t foram utilizadas para avaliar o comportamento dos dados após cada modificação realizada.

TABELA 16 – PARÂMETROS MODIFICADOS PARA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO

Parâmetro modificado	Varição 1	Nominal	Varição 2
Porcentagem de ácido fórmico na fase móvel (%)	0,09	0,10	0,11
Conc. de formiato de amônio na fase móvel (mmol L ⁻¹)	2,90	3,00	3,10
Proporção de aquoso na fase móvel (%)	9	10	11
Temperatura da coluna (°C)	18	20	22
Fluxo da fase móvel (μL.min ⁻¹)	198	200	202

3.4.7 Teste de estabilidade

3.4.7.1 Teste de estabilidade das soluções estoque

Solução estoque de cada analito foi preparada de acordo com a seção 3.3.1. Metade de cada solução estoque foi armazenada individualmente sob refrigeração a 4 °C e a outra metade em temperatura ambiente (22 a 25 °C). As amostras foram armazenadas por um período de 30 dias.

O ensaio foi conduzido através de uma sextuplicata de injeções de soluções de trabalho contendo uma mistura de 15 ng.mL⁻¹ de praziquantel, 20 ng.mL⁻¹ de albendazol, 100 ng.mL⁻¹ de ivermectina, 50 ng.mL⁻¹ de febantel, eprinomectina, pamoato de pirantel e impureza C do febantel e 30 ng.mL⁻¹ de impurezas A, B e C do praziquantel. Foi utilizado como diluente a fase móvel estabelecida (seção 3.3.1, pág. 73). As amostras foram filtradas em filtro de PVDF 0,22 µm antes das análises por CLAE-EM/EM.

A estabilidade foi avaliada através das ferramentas estatísticas Teste F e Teste t para comparação das áreas de cada composto obtidas de amostras recém-preparadas com aquelas obtidas após um, sete e 30 dias de armazenamento, nas respectivas temperaturas.

3.4.7.2 Teste de estabilidade da solução de trabalho

As amostras foram preparadas em sextuplicata nas mesmas concentrações do ensaio de estabilidade da solução estoque (seção 3.4.7.1). A estabilidade da solução de trabalho foi avaliada através das ferramentas estatísticas Teste F e Teste t para comparação das áreas de cada composto obtidas de amostras recém-preparadas com aquelas obtidas após um período de 24 horas no gerenciador de amostras (20 °C).

3.5 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DA IVERMECTINA

A ivermectina foi extraída separadamente dos demais analitos em virtude de que nas amostras de comprimidos, essa se encontra em uma concentração muito menor que as demais substâncias. Portanto uma diluição direta seria inviável para determinação simultânea dessa substância com os demais fármacos de interesse, pois sua concentração ficaria abaixo de seu limite de detecção, ou seja, seria indetectável.

De forma a extrair a ivermectina com a maior seletividade possível, duas técnicas de extração foram consideradas: a líquido-líquido e a em fase sólida. A escolha da técnica foi baseada na capacidade de retenção da ivermectina e na precisão da extração, ou seja, na capacidade de reprodutibilidade do método.

3.5.1 Extração líquido-líquido

No desenvolvimento da extração líquido-líquido da ivermectina foram avaliados quatro métodos:

Método 1:

Foi preparada uma solução contendo 50000 ng.mL⁻¹ de febantel, 48000 ng.mL⁻¹ de pamoato de pirantel, 17000 ng.mL⁻¹ de praziquantel e 20 ng.mL⁻¹ de ivermectina utilizando como diluente acetonitrila/metanol 50:50 v/v. Cerca de 10 mL dessa solução foram quantitativamente transferidos para um tubo Falcon (50 mL) contendo 10 mL de hexano. A amostra foi agitada em vortex por 1 minuto e em seguida centrifugada (4000 rpm) por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo Falcon e evaporado em concentrador de amostras (40 °C) por 120 minutos. O resíduo seco foi redissolvido (1 mL) e submetido a diferentes diluições de modo que o sinal dos analitos de maior concentração não ultrapassassem a intensidade de 2×10^6 cps (limite máximo de detecção recomendado pelo fabricante do espectrômetro de massas). A dissolução do resíduo e as diluições foram realizadas utilizando a fase móvel estabelecida (seção 3.3.1, pág 73).

Método 2:

Foi preparada uma solução contendo 50000 ng.mL⁻¹ de febantel, 48000 ng.mL⁻¹ de pamoato de pirantel, 17000 ng.mL⁻¹ de praziquantel e 20 ng.mL⁻¹ de ivermectina utilizando como diluente ácido fórmico (88%, v/v)/metanol 10:90 v/v. Cerca de 10 mL dessa solução foram quantitativamente transferidos para um tubo Falcon (50 mL) contendo 10 mL de hexano. A amostra foi agitada em vortex por 1 minuto e em seguida centrifugada (4000 rpm) por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo Falcon e evaporado em concentrador de amostras (40 °C) por 120 minutos. O resíduo foi redissolvido (1 mL) e submetido a diferentes diluições de modo que o sinal dos analitos de maior concentração não ultrapassassem a intensidade de 2×10^6 cps (limite máximo de detecção recomendado pelo fabricante do espectrômetro de massas). A dissolução do resíduo e as diluições foram realizadas utilizando a fase móvel estabelecida (seção 3.3.1, pág 73).

Método 3:

Foi preparada uma solução contendo 50000 ng.mL⁻¹ de febantel, 48000 ng.mL⁻¹ de pamoato de pirantel, 17000 ng.mL⁻¹ de praziquantel e 20 ng.mL⁻¹ de ivermectina utilizando como diluente ácido fórmico (88%, v/v)/água 10:90 v/v. Cerca de 10 mL dessa solução foram quantitativamente transferidos para um tubo Falcon (50 mL) contendo 10 mL de hexano. A amostra foi agitada em vortex por 1 minuto e em seguida centrifugada (4000 rpm) por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo Falcon e evaporado em concentrador de amostras (40 °C) por 120 minutos. O resíduo foi redissolvido (1 mL) e submetido a diferentes diluições de modo que o sinal dos analitos de maior concentração não ultrapassassem a intensidade de 2×10^6 cps (limite máximo de detecção recomendado pelo fabricante do espectrômetro de massas). A dissolução do resíduo e as diluições foram realizadas utilizando a fase móvel estabelecida (seção 3.3.1, pág 73).

Método 4:

Foi preparada uma solução contendo 50000 ng.mL⁻¹ de febantel, 48000 ng.mL⁻¹ de pamoato de pirantel, 17000 ng.mL⁻¹ de praziquantel e 20 ng.mL⁻¹ de ivermectina utilizando como diluente ácido fórmico (88%, v/v)/água 10:90 v/v. Cerca de 10 mL dessa solução foram quantitativamente transferidos para um tubo Falcon (50 mL) contendo 10 mL de éter etílico. A amostra foi agitada em vortex por 1 minuto e em seguida centrifugada (4000 rpm) por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo Falcon e evaporado em concentrador de amostras (40 °C) por 120 minutos. O resíduo foi redissolvido (1 mL) e submetido a diferentes diluições de modo que o sinal dos analitos de maior concentração não ultrapassassem a intensidade de 2×10^6 cps (limite máximo de detecção recomendado pelo fabricante do espectrômetro de massas). A dissolução do resíduo e as diluições foram realizadas utilizando a fase móvel estabelecida (seção 3.3.1, pág 73).

3.5.2 Extração em fase sólida

Para o desenvolvimento e otimização da extração em fase sólida dois cartuchos com diferentes sorbentes foram testados (Oasis MCX e Oasis HLB). Os métodos avaliados foram:

Método 1:

Uma solução contendo 600 ng.mL⁻¹ de ivermectina, 25 ng.mL⁻¹ de pamoato de pirantel e 100 ng.mL⁻¹ de febantel e praziquantel foi preparada utilizando como diluente ácido fórmico (88%, v/v)/metanol 5:95 v/v. Com o auxílio de vácuo, 1 mL da amostra foi eluída (1 mL.min⁻¹) em cartucho Oasis MCX previamente acondicionado com 1 mL de ácido acético glacial/acetonitrila 5:95 v/v. O sorbente foi lavado sucessivamente com 1 mL de acetona, 1 mL de metanol, 1 mL de acetonitrila e 1 mL de hidróxido de amônio (28%, p/p)/acetonitrila 5:95 v/v. Os eluatos foram recolhidos separadamente e evaporados em concentrador de amostra (40°C). Cada resíduo seco foi redissolvido com 1 mL da fase móvel estabelecida (seção 3.3.1, pág. 73). As

soluções redissolvidas foram analisadas por CLAE-EM/EM. O ensaio foi realizado em triplicata.

Método 2:

Uma solução contendo 600 ng.mL^{-1} de ivermectina, 25 ng.mL^{-1} de pamoato de pirantel e 100 ng.mL^{-1} de febantel e praziquantel foi preparada utilizando como diluente acetonitrila/água 25:75 v/v. Com o auxílio de vácuo, 1 mL da amostra foi eluída (1 mL.min^{-1}) em cartucho Oasis HLB previamente acondicionado com 1 mL de hexano, 1 mL de acetona, 1 mL de acetonitrila, 1 mL de água ultra pura e 1 mL de acetonitrila/água 25:75 v/v. Em seguida o sorbente foi lavado sucessivamente com 1 mL de água ultra pura, 1 mL de acetonitrila/água 25:75 v/v, 1 mL de acetonitrila/água 35:65 v/v, 1 mL de acetonitrila/água 40:60 v/v e 1 mL de acetonitrila. Cada eluato recolhido foi diretamente analisado por CLAE-EM/EM. Esse ensaio foi realizado em triplicata.

Método 3:

Uma solução contendo 50000 ng.mL^{-1} de febantel, 48000 ng.mL^{-1} de pamoato de pirantel, 17000 ng.mL^{-1} de praziquantel e 20 ng.mL^{-1} de ivermectina foi preparada utilizando como diluente acetonitrila/água 25:75 v/v. Com o auxílio de vácuo, 1 mL da amostra foi eluída (1 mL.min^{-1}) em cartucho Oasis HLB previamente acondicionado com 1 mL de hexano, 1 mL de acetona, 1 mL de acetonitrila, 1 mL de água ultra pura e 1 mL de acetonitrila/água 25:75 v/v. Em seguida o sorbente foi lavado 20 vezes com 1 mL de acetonitrila/água 25:75 v/v e uma vez com 1 mL de acetonitrila pura. A alíquota de acetonitrila foi recolhida, evaporada em concentrador de amostra (40°C) e o resíduo seco redissolvido com $200 \mu\text{L}$ da fase móvel estabelecida (seção 3.3.1, pág. 73). A solução redissolvida foi analisada por CLAE-EM/EM. O ensaio foi realizado em triplicata.

Método 4:

O preparo da amostra do método 4 foi similar ao proposto no método 3, porém utilizando acetonitrila/água 35:65 v/v como solução diluente e de lavagem. As demais condições não foram modificadas.

Método 5:

O preparo da amostra do método 5 foi similar ao proposto no método 3, porém utilizando ácido fórmico (88%, v/v)/acetonitrila/água 10:25:65 v/v/v como solução diluente e de lavagem. As demais condições não foram modificadas.

Método 6:

O preparo da amostra do método 6 também foi similar ao proposto no método 3, porém utilizando como solução diluente e de lavagem ácido fórmico (88%, v/v)/acetonitrila/água 10:35:55 v/v/v. As demais condições não foram modificadas.

3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE ANTIPARASITÁRIOS PARA DETERMINAÇÃO VIA CLAE-EM/EM

O método validado foi aplicado para amostras comerciais de comprimidos contendo a associação de ivermectina, febantel, praziquantel e pamoato de pirantel, bem como para uma amostra contendo somente ivermectina. O preparo de cada amostra é descrito separadamente para facilitar a compreensão do leitor.

3.6.1 Preparo dos comprimidos contendo associações dos antiparasitários

3.6.1.1 Preparo dos comprimidos para determinação do febantel, praziquantel e pamoato de pirantel

Para determinação do febantel, praziquantel e pamoato de pirantel, vinte comprimidos de cada amostra (seção 3.1.1, pág. 68) foram pulverizados e uma quantidade do pó (equivalente ao valor teórico de 25 mg de febantel, 24 mg de pamoato de pirantel, 8,33 mg de praziquantel e 0,01 mg de ivermectina) foi exatamente pesada e transferida para um balão volumétrico de 50 mL. Na sequência foi acrescentado 10 mg de albendazol e 0,005 mg de eprinomectina

(padrões internos). Uma alíquota de 30 mL de acetonitrila/metanol 50:50 v/v foi adicionada ao balão que, em seguida, foi submetido a agitação mecânica (30 rpm) e sonicação por 10 minutos cada. O volume foi completado com o mesmo diluente e a amostra foi homogeneizada e filtrada em papel de filtro quantitativo. O filtrado foi diluído 1:10000 v/v utilizando como diluente a fase móvel (seção 3.3.1, pág. 73). As amostras foram filtradas em filtro de PVDF 0,22 µm antes das análises por CLAE-EM/EM. O preparo da amostra foi conduzido ao abrigo da luz.

3.6.1.2 Preparo dos comprimidos para determinação da ivermectina

Para determinação da ivermectina, vinte comprimidos de cada amostra (seção 3.1.1, pág. 68) foram pulverizados e uma quantidade do pó (equivalente ao valor teórico de 25 mg de febantel, 24 mg de pamoato de pirantel, 8,33 mg de praziquantel e 0,01 mg de ivermectina) foi exatamente pesada e transferida para um balão volumétrico de 50 mL. Na sequência foi acrescentado 10 mg de albendazol e 0,005 mg de eprinomectina (padrões internos). Uma alíquota de 30 mL de acetonitrila/metanol 50:50 v/v foi adicionada ao balão que, em seguida, foi submetido a agitação mecânica (30 rpm) e sonicação por 10 minutos cada. O volume foi completado com o mesmo diluente e a amostra foi homogeneizada e filtrada em papel de filtro quantitativo. O filtrado foi diluído 1:10 v/v utilizando como diluente acetonitrila/água 35:65 v/v. Uma alíquota de 1 mL dessa solução foi transferida para um cartucho Oasis HLB previamente acondicionado com 1 mL de hexano, 1 mL de acetona, 1 mL de acetonitrila, 1 mL de água ultra pura e 1 mL de acetonitrila/água 35:65 v/v. O sorbente foi sucessivamente lavado com 1 mL de acetonitrila/água 35:65 v/v (20 vezes) e uma única vez com 1 mL de acetonitrila pura. A alíquota de acetonitrila foi recolhida e evaporada (concentrador de amostra, 40°C). O resíduo seco foi redissolvido com 200 µL da fase móvel (seção 3.3.1, pág. 73) e amostra foi analisada por CLAE-EM/EM.

3.6.2 Preparo da amostra de uso humano contendo ivermectina

3.6.2.1 Preparo por diluição direta

Para determinação da ivermectina, vinte comprimidos da amostra 1 (seção 3.1.1, pág. 68) foram pulverizados e uma quantidade do pó (equivalente ao valor teórico de 5 mg de ivermectina) foi exatamente pesada e transferida para um balão volumétrico de 25 mL. Na sequência foi acrescentado 2,5 mg de eprinomectina (padrão interno). Uma alíquota de 15 mL de acetonitrila/metanol 50:50 v/v foi adicionada ao balão que, em seguida, foi submetido a agitação mecânica (30 rpm) e sonicação por 10 minutos cada. O volume foi completado com o mesmo diluente e a amostra foi homogeneizada e filtrada em papel de filtro quantitativo. O filtrado foi diluído 1:2000 v/v utilizando como diluente a fase móvel (seção 3.3.1, pág. 73). As amostras foram filtradas em filtro de PVDF 0,22 µm antes das análises por CLAE-EM/EM.

3.6.2.2 Preparo por extração em fase sólida

Para determinação da ivermectina, vinte comprimidos da amostra 1 (seção 3.1.1, pág. 68) foram pulverizados e uma quantidade do pó (equivalente ao valor teórico de 5 mg de ivermectina) foi exatamente pesada e transferida para um balão volumétrico de 25 mL. Na sequência foi acrescentado 2,5 mg de eprinomectina (padrão interno). Uma alíquota de 15 mL de acetonitrila/metanol 50:50 v/v foi adicionada ao balão que, em seguida, foi submetido a agitação mecânica (30 rpm) e sonicação por 10 minutos cada. O volume foi completado com o mesmo diluente e a amostra foi homogeneizada e filtrada em papel de filtro quantitativo. O filtrado foi diluído 1:10000 v/v utilizando como diluente acetonitrila/água 35:65 v/v. Uma alíquota de 1 mL dessa solução foi transferida para um cartucho Oasis HLB previamente acondicionado com 1 mL de hexano, 1 mL de acetona, 1 mL de acetonitrila, 1 mL de água ultra pura e 1 mL de acetonitrila/água

35:65 v/v. O sorbente foi sucessivamente lavado com 1 mL de acetonitrila/água 35:65 v/v (20 vezes) e uma única vez com 1 mL de acetonitrila pura. A alíquota de acetonitrila foi recolhida e evaporada (concentrador de amostra, 40°C). O resíduo seco foi redissolvido com 200 µL da fase móvel (seção 3.3.1, pág. 73) e amostra foi analisada por CLAE-EM/EM.

3.7 PARÂMETROS DO MÉTODO CLAE-EM/EM PARA DETERMINAÇÃO DOS ANTIPARASITÁRIOS

Os parâmetros cromatográficos definidos para o método foram:

- Pré-coluna cromatográfica XBridge C8 (10 x 2,1; 5 µm) e coluna cromatográfica XBridge C8 (50 x 2,1; 5 µm);
- Fase móvel: mistura 10:90 v/v de água e acetonitrila/água (95:5 v/v), ambos contendo 0,10% de ácido fórmico e 3 mmol L⁻¹ de formiato de amônio (seção 3.3.1, pág. 73). Modo de eluição isocrático.
- Fluxo: 200 µL min⁻¹
- Volume de injeção: 20 µL
- Temperatura da coluna: 20 °C
- Solução para limpeza da seringa do injetor automático: acetonitrila/metanol (50:50 v/v)

Os parâmetros definidos para a fonte de ionização do espectrômetro de massas estão descritos nos Quadro 2 enquanto que os parâmetros individuais de cada analito no Quadro 3:

Parâmetros da fonte	Modo de ionização positivo
Gás de interface (CUR)	10 psi
Dissociação induzida por colisão (CAD)	4 psi
Voltagem do capilar (IS)	5000 V
Gás de nebulização (GS1)	45 psi
Gás secante (GS2)	40 psi
Temperatura da fonte	450 °C

QUADRO 2 - PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

Analitos [M+NH ₄] ⁺ e [M+H] ⁺											
Ivermectina 892,3		Febantel 447,0		Pirantel 207,2		Praziquantel 313,3		Impureza C do Febantel 300,1			
Fragmentos mais intensos (m/z)											
Parâmetros		145,1	307,2	383,2	415,1	136,2	150,2	174,3	203,3	159,1	268,2
CE (energia de colisão) - V		45	35	21	19	39	37	15	37	47	25
CXP (pot. saída da cela de colisão) - V		4	6	34	32	4	4	4	4	4	6
CEP (pot. entrada da cela de colisão) - V		34	34	20	20	14	14	15	16	16	16
DP (potencial de desaglomeração) - V		41	41	26	26	46	46	31	36	46	46
EP (potencial de entrada) - V		8,5	8,5	8	8	5	5	7	9,5	8	8
Analitos [M+H] ⁺											
Impureza A do Praziquantel 307,1		Impureza B do Praziquantel 311,2		Impureza C do Praziquantel 343,2		Albendazol* 266,1		Eprinomectina* 914,2			
Fragmentos mais intensos (m/z)											
Parâmetros		77,1	105,0	173,1	201,2	148,1	233,1	191,0	234,2	154,2	186,2
CE (energia de colisão) - V		21	71	33	33	23	23	50	41	49	33
CXP (pot. saída da cela de colisão) - V		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CEP (pot. entrada da cela de colisão) - V		14	16	15	18	16	16	13	16	34	34
DP (potencial de desaglomeração) - V		41	36	26	41	36	31	50	41	31	31
EP (potencial de entrada) - V		10	9	7	10	9	7	10	7,5	7	7

QUADRO 3 – PARÂMETROS OTIMIZADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA CADA FÁRMACO, IMPUREZA E PADRÃO INTERNO
 NOTA: *padrão interno; V - volts

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDO DA SOLUBILIDADE DOS FÁRMACOS

O estudo da solubilidade dos fármacos ivermectina, febantel, praziquantel e pamoato de pirantel foi um importante critério avaliado tanto para a otimização da etapa de preparo das amostras quanto para o desenvolvimento do método de análise, visto que as substâncias de interesse deste trabalho possuem características físico-químicas diferentes.

A solubilidade dos fármacos foi classificada de acordo com os termos adotados pela Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2005a). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 17:

TABELA 17 – SOLUBILIDADE DOS FÁRMACOS EM DIFERENTES SOLVENTES

Solventes	Fármacos			
	<i>Ivermectina</i>	<i>Febantel</i>	<i>Praziquantel</i>	<i>Pamoato de pirantel</i>
<i>Acetato de etila</i>	Solúvel	Ligeiramente solúvel	Solúvel	Muito pouco solúvel
<i>Acetonitrila</i>	Solúvel	Ligeiramente solúvel	Solúvel	Muito pouco solúvel
<i>Água</i>	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel
<i>Clorofórmio</i>	Ligeiramente solúvel	Ligeiramente solúvel	Facilmente solúvel	Insolúvel
<i>Etanol</i>	Solúvel	Pouco solúvel	Facilmente solúvel	Muito pouco solúvel
<i>Éter etílico</i>	Pouco solúvel	Pouco solúvel	Pouco solúvel	Insolúvel
<i>Hexano</i>	Muito pouco solúvel	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel
<i>Metanol</i>	Solúvel	Ligeiramente solúvel	Solúvel	Muito pouco solúvel
<i>Éter metil-t-butílico</i>	Ligeiramente solúvel	Ligeiramente solúvel	Solúvel	Insolúvel
<i>Tolueno</i>	Solúvel	Insolúvel	Solúvel	Insolúvel

Como observado, os fármacos apresentaram boa solubilidade em acetonitrila ou metanol, exceto o pamoato de pirantel que apresentou baixa solubilidade em todos os solventes testados. Entretanto, a Farmacopéia Européia (EUROPEAN, 2007) descreve que o pamoato de pirantel apresenta boa solubilidade

em dimetilsulfóxido (DMSO) e, em virtude disso, misturas de acetonitrila com DMSO foram utilizadas para avaliar a solubilidade. Foram consideradas ainda misturas de acetonitrila com metanol.

Dentre as diferentes misturas avaliadas, a 10:90 v/v de DMSO e acetonitrila e a 40:60 e 50:50 v/v de metanol e acetonitrila foram as que promoveram completa solubilização de todos os fármacos (Tabela 18). Considerando que a acetonitrila e metanol são solventes comuns e de fácil obtenção, optou-se pela mistura 50:50 v/v de metanol e acetonitrila como diluente.

TABELA 18 – SOLUBILIDADE DOS FÁRMACOS EM DIFERENTES MISTURAS DE ACETONITRILA COM DIMETILSULFÓXIDO OU METANOL

Mistura de solventes	Fármacos			
	<i>Ivermectina</i>	<i>Febantel</i>	<i>Praziquantel</i>	<i>Pamoato de pirantel</i>
<i>DMSO:acetonitrila</i> (2,5:97,5 v/v)	Solúvel	Solúvel	Solúvel	Insolúvel
<i>DMSO:acetonitrila</i> (5:95 v/v)	Solúvel	Solúvel	Solúvel	Insolúvel
<i>DMSO:acetonitrila</i> (10:90 v/v)	Solúvel	Solúvel	Solúvel	Solúvel
<i>Metanol:acetonitrila</i> (30:70 v/v)	Solúvel	Solúvel	Solúvel	Insolúvel
<i>Metanol:acetonitrila</i> (40:60 v/v)	Solúvel	Solúvel	Solúvel	Solúvel
<i>Metanol:acetonitrila</i> (50:50 v/v)	Solúvel	Solúvel	Solúvel	Solúvel

4.2 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM/EM

4.2.1 Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas

4.2.1.1 Otimização da ionização dos analitos

Para o desenvolvimento do método a fonte de ionização *electrospray* (ESI) foi selecionada, tendo em vista a sua robustez e sensibilidade. Soluções de trabalho foram preparadas com diferentes aditivos (ácido acético, ácido fórmico, acetato de amônio e formiato de amônio) e infundidas separadamente no espectrômetro de

massas. Foram avaliados o modo de ionização, a intensidade e a estabilidade do sinal através do modo *Multiple Ions* (MI).

Para todos os analitos foram observadas moléculas ionizadas na forma protonada $[M+H]^+$, exceto a ivermectina que apresentou em maior abundância a forma de aduto de amônio $[M+NH_4]^+$. Além disso, foi verificado que diferentes concentrações de aditivos proporcionavam diferentes respostas de sinal.

Uma boa intensidade de sinal foi observada para todos os analitos ao utilizar como aditivo a combinação de ácido acético com acetato de amônio. No entanto uma coloração esverdeada foi observada na seringa durante a infusão no espectrômetro de massas, e em virtude disso foram consideradas somente as combinações de ácido fórmico com acetato ou formiato de amônio para a otimização da ionização.

Dentre todas as combinações testadas, a com 3 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio e 1% de ácido fórmico foi a que promoveu uma boa intensidade de sinal para a maioria dos analitos quando comparado com as demais (Gráfico 1).

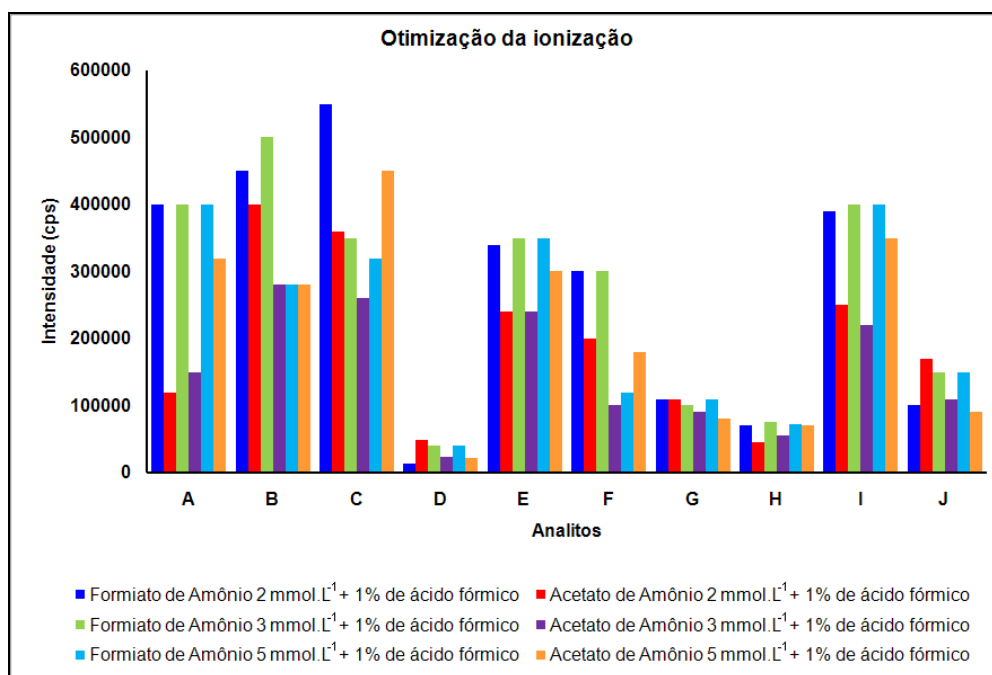


GRÁFICO 1 – INTENSIDADE DE SINAL DOS ANALITOS UTILIZANDO DIFERENTES COMBINAÇÕES DE ADITIVOS

NOTA: A - 100 ng.mL⁻¹ de febantel; B - 25 ng.mL⁻¹ de pamoato de pirantel; C - 100 ng.mL⁻¹ de praziquantel; D - 100 ng.mL⁻¹ de ivermectina; E - 100 ng.mL⁻¹ de impureza C do febantel; F - 100 ng.mL⁻¹ de impureza A do praziquantel; G - 100 ng.mL⁻¹ de impureza B do praziquantel; H - 100 ng.mL⁻¹ de impureza C do praziquantel; I - 100 ng.mL⁻¹ de albendazol e J - 300 ng.mL⁻¹ de eprinomectina.

Apesar do bom resultado obtido com a combinação de 3 mmol.L^{-1} de formiato de amônio e 1% de ácido fórmico, há relatos na literatura de que soluções muito ácidas podem favorecer a hidrólise da ivermectina (KROGH *et al.*, 2008). Nesse contexto, foi avaliado o impacto da redução de ácido fórmico na ionização dos analitos.

Como resultado a adição de 0,1% de ácido fórmico melhorou consideravelmente a intensidade de sinal dos analitos, exceto o pamoato de pirantel que reduziu aproximadamente 30% da sua intensidade de sinal (Gráfico 2). Considerando que o pamoato de pirantel apresenta uma excelente ionização, essa perda de sinal não foi relevante para sua determinação. Portanto, a combinação de 3 mmol.L^{-1} de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico foi escolhida para compor o diluente e fase móvel. O espectro de varredura dos compostos é apresentado nas Figuras 10 e 11.

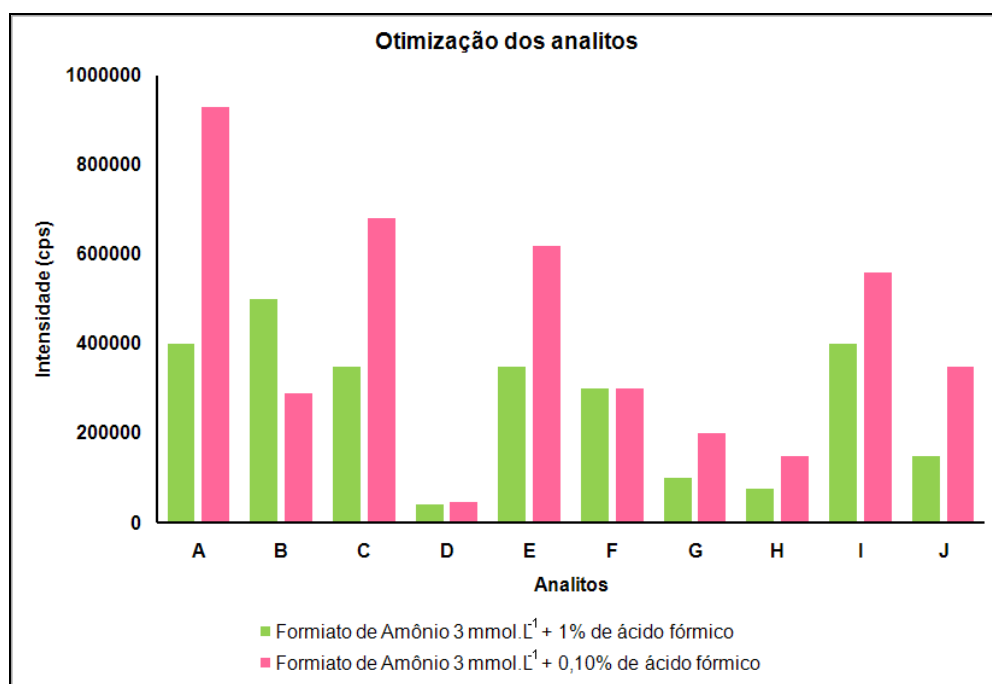


GRÁFICO 2 – COMPARAÇÃO DA INTENSIDADE DE SINAL DOS ANALITOS UTILIZANDO 3 mmol.L^{-1} DE FORMIATO DE AMÔNIO COMBINADO COM 1% E 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO

NOTA: A - 100 ng.mL^{-1} de febantel; B - 25 ng.mL^{-1} de pamoato de pirantel; C - 100 ng.mL^{-1} de praziquantel; D - 100 ng.mL^{-1} de ivermectina; E - 100 ng.mL^{-1} de impureza C do febantel; F - 100 ng.mL^{-1} de impureza A do praziquantel; G - 100 ng.mL^{-1} de impureza B do praziquantel; H - 100 ng.mL^{-1} de impureza C do praziquantel; I - 100 ng.mL^{-1} de albendazol e J - 300 ng.mL^{-1} de eprinomectina.

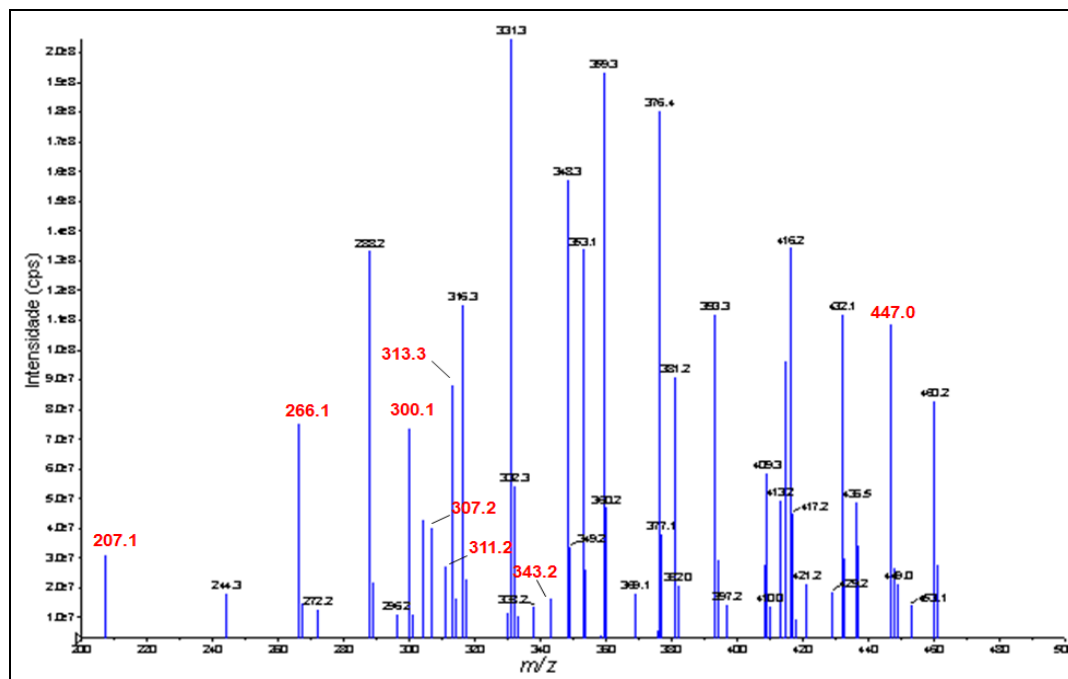


FIGURA 10 – ESPECTRO DE VARREDURA (200 A 500 m/z) DA MISTURA DE ANALITOS
 NOTA: $[M+H]^+$: 207,1 – Pirantel; $[M+H]^+$: 266,1 – Albendazol; $[M+H]^+$: 300,1 – Impureza C do Febantel; $[M+H]^+$: 307,2 – Impureza A do Praziquantel; $[M+H]^+$: 311,2 – Impureza B do Praziquantel; $[M+H]^+$: 313,3 – Praziquantel; $[M+H]^+$: 343,2 – Impureza C do Praziquantel e $[M+H]^+$: 447,0 – Febantel. A impureza A do pirantel não foi incluída na mistura, visto que apresenta mesma m/z que o pirantel.

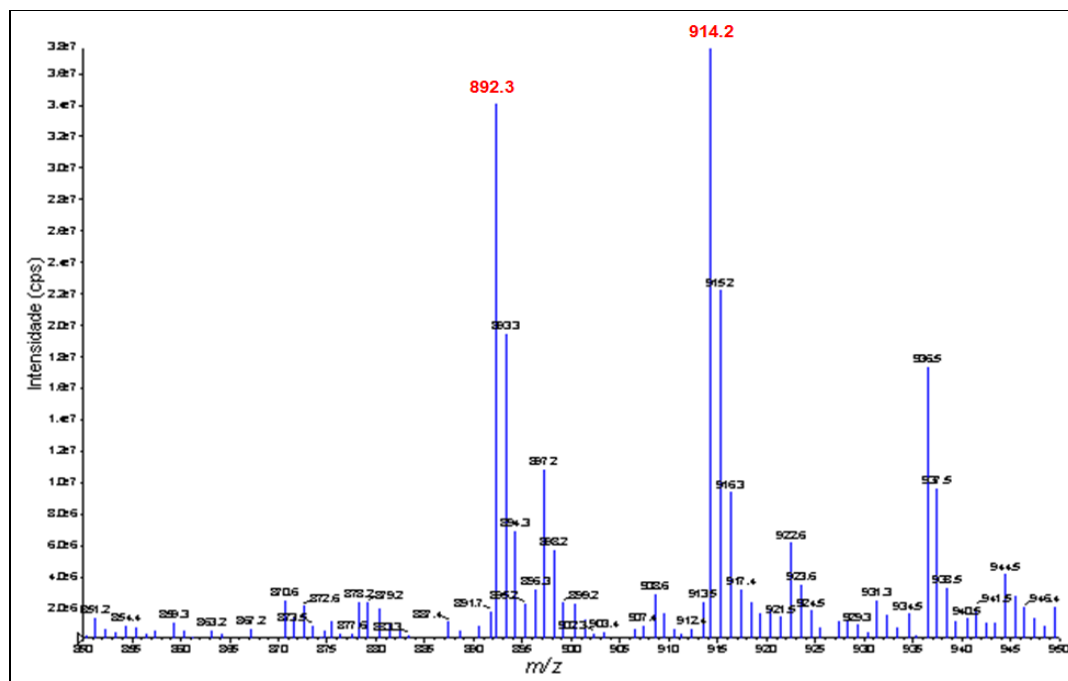


FIGURA 11 – ESPECTRO DE VARREDURA (850 A 950 m/z) DA MISTURA DE ANALITOS
 NOTA: $[M+NH_4]^+$: 892,3 – Ivermectina; $[M+H]^+$: 914,2 – Eprinomectina

Apenas como observação, o metanol não foi testado na composição do diluente/fase móvel devido ao fato de conter traços de sódio, o que contribuiria para a formação de adutos de sódio $[M+Na]^+$ para a ivermectina. Segundo Durden (2007), os adutos de sódio são mais estáveis quando comparados aos adutos de amônio, porém necessitam de altas energias de colisão para fragmentarem, gerando poucos íons fragmentos. Além disso, tende a formar curvas de calibração não muito lineares e pouco reprodutíveis, o que é indesejável em um método de quantificação.

4.2.1.2 Análise por Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Uma vez otimizada a ionização dos analitos a próxima etapa foi a realização do experimento de MRM. A concentração dos analitos que promoveu uma intensidade de sinal adequada para realização desse experimento foi de 25 ng.mL⁻¹ de pamoato de pirantel, 300 ng.mL⁻¹ de eprinomectina, 600 ng.mL⁻¹ de ivermectina e 100 ng.mL⁻¹ de febantel, praziquantel, albendazol, impureza C do febantel e impurezas A, B e C do praziquantel. Nessas concentrações os parâmetros individuais de cada analito foram otimizados (DP, EP, CEP, CE e CXP) sendo obtidos ao término do experimento dois íons fragmentos mais intensos de cada analito (Quadro 4). O íon de maior intensidade foi utilizado para quantificação e o segundo maior em intensidade para qualificação, exceto para as impurezas A e C do praziquantel, as quais apresentam fragmentos idênticos (55,2 e 83,2 *m/z*) e, portanto se fez necessária a escolha de íons distintos e de menor intensidade. Além disso, o ensaio demonstrou que todos os íons fragmentos do pirantel e de sua impureza A são idênticos, pois se trata de isômeros *cis* e *trans*, o que dificulta a análise simultânea desses dois analitos. Em função disso, optou-se por excluir a impureza A desse trabalho priorizando somente a determinação do pirantel. Como representação ilustrativa, somente o espectro com os íons fragmentos da ivermectina é apresentado (Figura 12).

Analitos [M+NH ₄] ⁺ e [M+H] ⁺													
		Ivermectina 892,3	Febantel 447,0	Pirantel 207,2		Praziquantel 313,3	Impureza C do Febantel 300,1		Impureza A do Pirantel 207,2				
Parâmetros		145,1	307,2	383,2	415,1	136,2	150,2	174,3	203,3	159,1	268,2	136,2	150,2
Fragmentos mais intensos (m/z)													
CE (V)		45	35	21	19	39	37	15	37	47	25	39	35
CXP (V)		4	6	34	32	4	4	4	4	4	6	4	4
CEP (V)		34	34	20	20	14	14	15	16	16	16	14	14
DP (V)		41	41	26	26	46	46	31	36	46	46	46	46
EP (V)		8,5	8,5	8	8	5	5	7	9,5	8	8	5	5
Analitos [M+H] ⁺													
		Impureza A do Praziquantel 307,1	Impureza B do Praziquantel 311,2	Impureza C do Praziquantel 343,2		Albendazol* 266,1	Eprinomectina* 914,2						
Parâmetros		77,1	105,0	173,1	201,2	148,1	233,1	191,0	234,2	154,2	186,2		
CE (V)		21	71	33	33	23	23	50	41	49	33		
CXP (V)		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
CEP (V)		14	16	15	18	16	16	13	16	34	34		
DP (V)		41	36	26	41	36	31	50	41	31	31		
EP (V)		10	9	7	10	9	7	10	7,5	7	7		

QUADRO 4 - PARÂMETROS OTIMIZADOS ATRAVÉS DO EXPERIMENTO DE MRM PARA OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS MAIS INTENSOS DE CADA ANALITO
 NOTA: * Padrão interno; V - volts

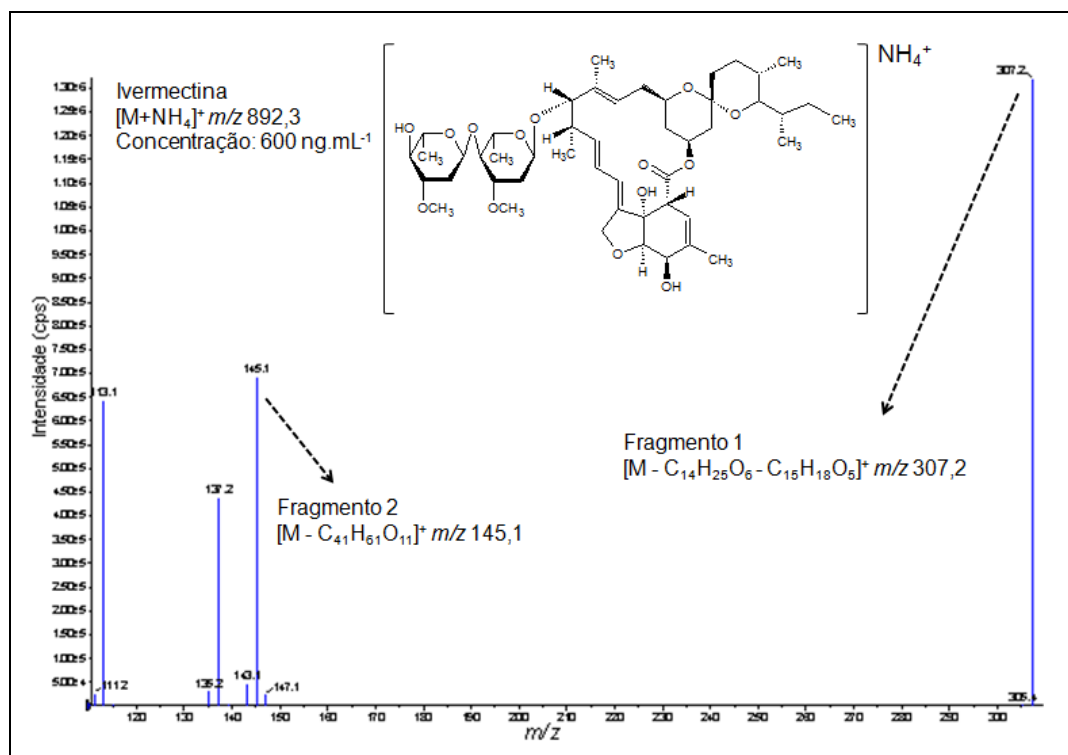


FIGURA 12 – ÍONS FRAGMENTOS DA IVERMECTINA ($[M+NH_4]^+$ m/z 892,3) OBTIDOS ATRAVÉS DE MRM

NOTA: O fragmento 1 (m/z 307,2) é formado pela perda de dois monossacarídeos, com subsequente rearranjo de McLafferty e clivagem alílica. O fragmento 2 (m/z 145,1) se refere a uma unidade de monossacarídeo (GIANELLI *et al.*, 2000; BEASLEY *et al.*, 2006).

4.2.1.3 Análise por injeção em fluxo (FIA)

Concluído o experimento de MRM os parâmetros da fonte de ionização foram otimizados através da análise por injeção em fluxo (FIA). Essa etapa consistiu no acoplamento do cromatógrafo ao espectrômetro de massas, sem a necessidade do uso de coluna cromatográfica. Foram otimizados os parâmetros CUR, CAD, GS1, GS2, IS e temperatura da fonte. Os valores otimizados destes parâmetros são descritos no Quadro 5.

Parâmetros da fonte	Modo de ionização positivo
Gás de interface (CUR)	10 psi
Gás de colisão (CAD)	4 psi
Voltagem do capilar (IS)	5000 V
Gás de nebulização (GS1)	45 psi
Gás secante (GS2)	40 psi
Temperatura da fonte (°C)	450 °C

QUADRO 5 - PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO OTIMIZADOS ATRAVÉS DE ANÁLISES POR INJEÇÃO EM FLUXO.

4.2.2 Otimização da cromatografia

Os parâmetros cromatográficos iniciais utilizados para desenvolver o método foram baseados nos dados da revisão bibliográfica, ou seja, nos pontos em comum entre os métodos existentes para quantificação da ivermectina, febantel, praziquantel e pamoato de pirantel.

Dessa forma foi utilizado uma coluna XBridge C18 (100 x 2,1 mm, 5 µm), mantida a temperatura de 20°C. A fase móvel consistiu em uma mistura 50:50 v/v de água e acetonitrila/água (95:5 v/v), ambos contendo 0,1% de ácido fórmico e 3 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio. O modo de eluição foi isocrático e o fluxo foi mantido em 200 µL.min⁻¹. Conforme demonstrado na Figura 13, nessas condições tanto a ivermectina quanto o padrão interno eprinomectina não eluíram em até 20 minutos de corrida.

Na tentativa de reduzir a retenção desses analitos, a proporção de solvente orgânico na fase móvel foi aumentada de 50 para 90%. Com essa modificação os tempos de retenção da eprinomectina e da ivermectina reduziram consideravelmente (Tr: 3,1 e 6,3 min, respectivamente), mas não o suficiente para aproximar a ivermectina dos demais analitos (Figura 14).

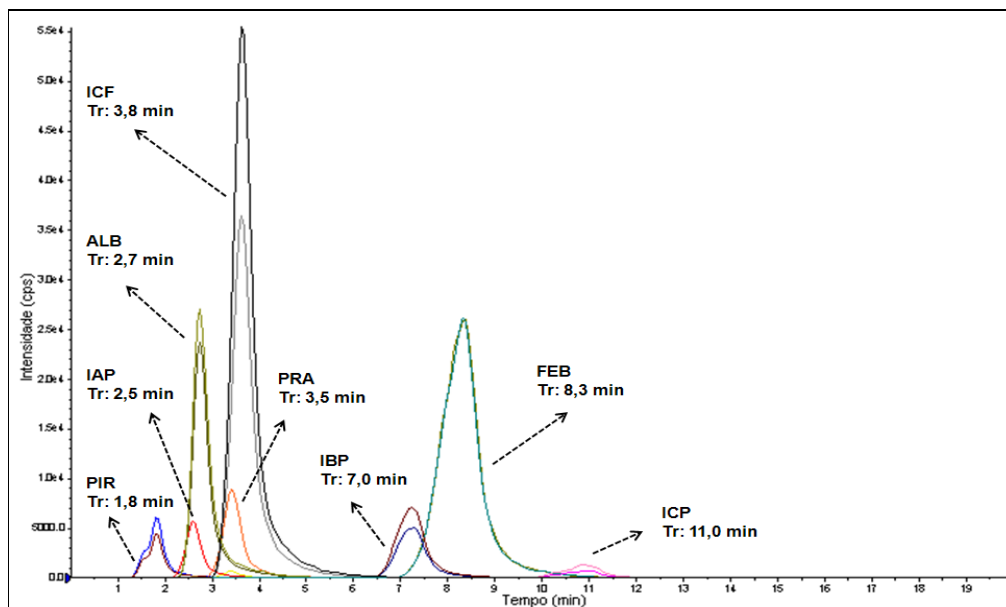


FIGURA 13 - CROMATOGRAMA DOS FÁRMACOS, IMPUREZAS E PADRÕES INTERNOS OBTIDO ATRAVÉS DO USO DA COLUNA XBRIDGE C18 (100 x 2,1 mm, 5 μ m) E FASE MÓVEL 50:50 v/v DE ÁGUA E ACETONITRILA/ÁGUA (95:5 v/v), AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO E 3 mmol.L⁻¹ DE FORMIATO DE AMÔNIO, ELUÍDA NO MODO ISOCRÁTICO.

NOTA: ALB: albendazol; FEB: febantel; ICF: impureza C febantel; IAP: impureza A praziquantel; IBP: impureza B praziquantel; ICP: impureza C praziquantel; PIR: pirantel; PRA: praziquantel; Temperatura de forno: 20°C; Volume de injeção: 20 μ l.

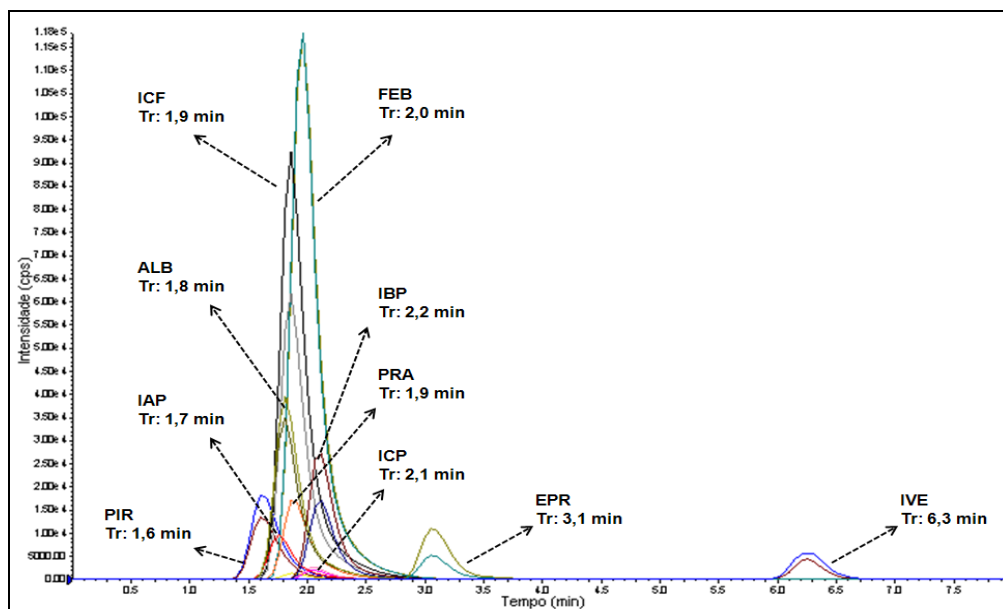


FIGURA 14 - CROMATOGRAMA DOS FÁRMACOS, IMPUREZAS E PADRÕES INTERNOS OBTIDO ATRAVÉS DO USO DA COLUNA XBRIDGE C18 (100 x 2,1 mm, 5 μ m) E FASE MÓVEL 10:90 v/v DE ÁGUA E ACETONITRILA/ÁGUA (95:5 v/v), AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO E 3 mmol.L⁻¹ DE FORMIATO DE AMÔNIO, ELUÍDA NO MODO ISOCRÁTICO.

NOTA: ALB: albendazol; EPR: eprinomectina; FEB: febantel; ICF: impureza C febantel; IAP: impureza A praziquantel; IBP: impureza B praziquantel; ICP: impureza C praziquantel; IVE: ivermectina; PIR: pirantel; PRA: praziquantel; Temperatura de forno: 20 °C; Volume de injeção: 20 μ l.

Na tentativa de aproximar a ivermectina dos demais analitos e assim reduzir o tempo de análise, uma coluna de menor comprimento (XBridge C18 50 x 2,1 mm, 5 µm) foi utilizada, mantendo a fase móvel na proporção 10:90 v/v. No entanto, como ilustrado na Figura 15, não ocorreu redução significativa no tempo de retenção da ivermectina.

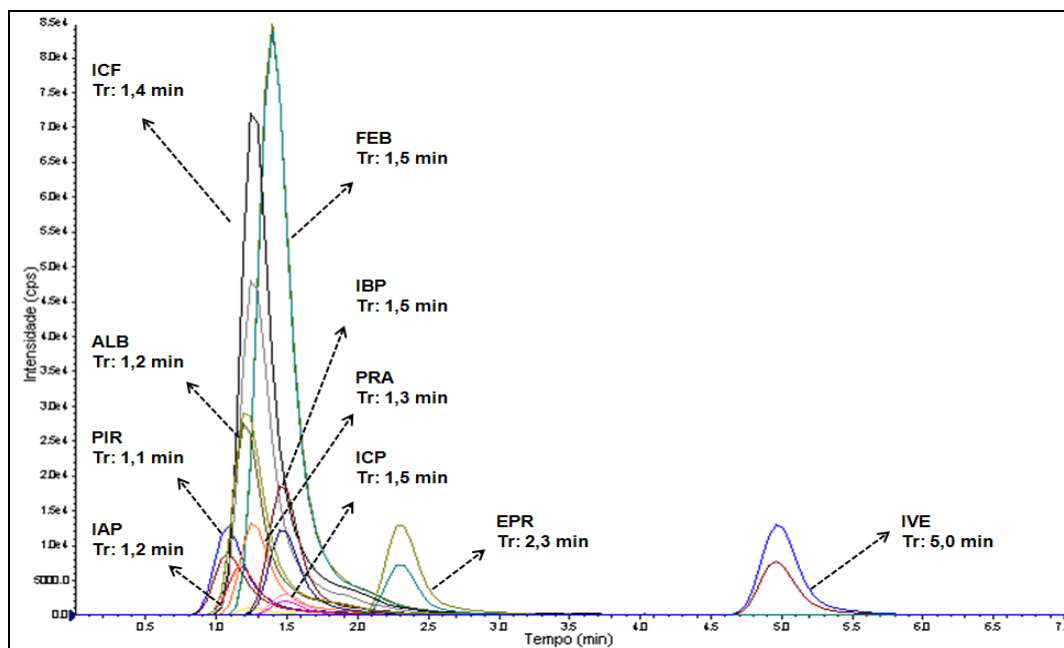


FIGURA 15 - CROMATOGRAMA DOS FÁRMACOS, IMPUREZAS E PADRÕES INTERNOS OBTIDO ATRAVÉS DO USO DA COLUNA XBRIDGE C18 (50 x 2,1 mm, 5 µm) E FASE MÓVEL 10:90 v/v DE ÁGUA E ACETONITRILA/ÁGUA (95:5 v/v), AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO E 3 mmol.L⁻¹ DE FORMIATO DE AMÔNIO, ELUÍDA NO MODO ISOCRÁTICO.

NOTA: ALB: albendazol; EPR: eprinomectina; FEB: febantel; ICF: impureza C febantel; IAP: impureza A praziquantel; IBP: impureza B praziquantel; ICP: impureza C praziquantel; IVE: ivermectina; PIR: pirantel; PRA: praziquantel; Temperatura de forno: 20 °C; Volume de injeção: 20 µl.

Visando reduzir o tempo de retenção da ivermectina optou-se por usar uma coluna com fase estacionária de média polaridade, a C8. Para fins comparativos, uma análise foi realizada nas mesmas condições iniciais da coluna C18 (50:50 v/v) e, novamente, a ivermectina não eluiu em até 20 minutos de corrida, conforme demonstrado na Figura 16. Uma análise em gradiente foi então realizada, iniciando a corrida com 30% de orgânico. Entretanto, o aumento de água no início da corrida cromatográfica promoveu um alargamento dos picos do pirantel, albendazol e impureza A do praziquantel. Além disso, o perfil do pico cromatográfico do pirantel ficou comprometido (Figura 17).

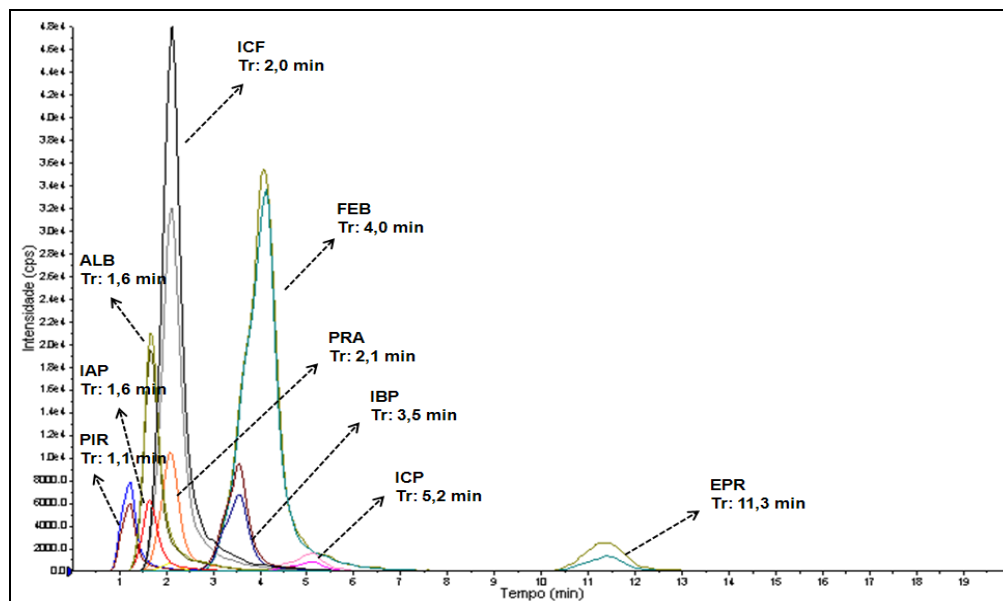


FIGURA 16 - CROMATOGRAMA DOS FÁRMACOS, IMPUREZAS E PADRÕES INTERNOS OBTIDO ATRAVÉS DO USO DA COLUNA XBRIDGE C8 (50 x 2,1 mm, 5 μ m) E FASE MÓVEL 50:50 v/v DE ÁGUA E ACETONITRILA/ÁGUA (95:5 v/v), AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO E 3 mmol.L⁻¹ DE FORMIATO DE AMÔNIO, ELUÍDA NO MODO ISOCRÁTICO.

NOTA: ALB: albendazol; EPR: eprinomectina; FEB: febantel; ICF: impureza C febantel; IAP: impureza A praziquantel; IBP: impureza B praziquantel; ICP: impureza C praziquantel; PIR: pirantel; PRA: praziquantel; Temperatura de forno: 20 °C; Volume de injeção: 20 μ l.

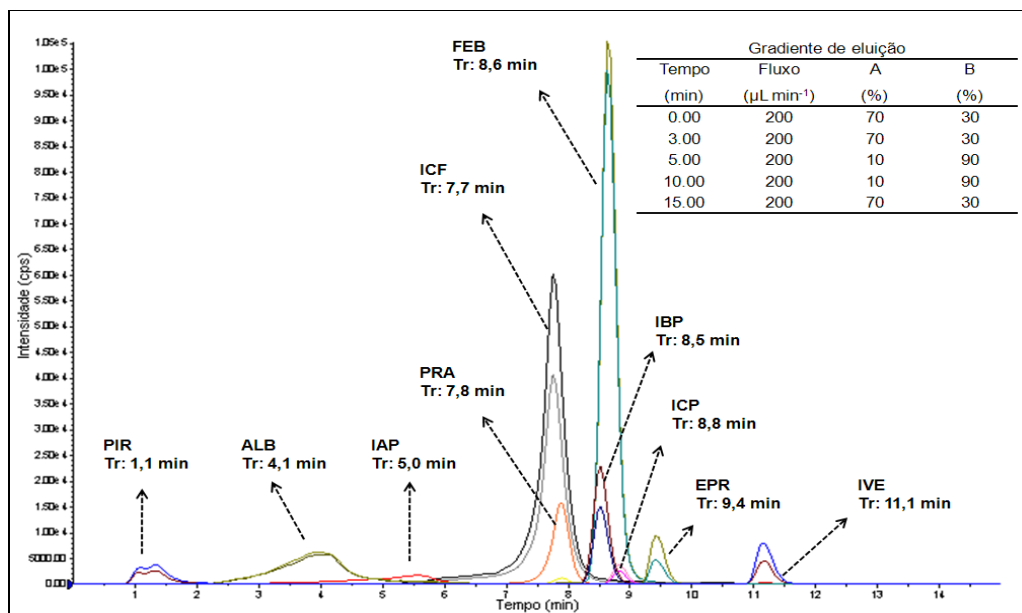


FIGURA 17 - CROMATOGRAMA DOS FÁRMACOS, IMPUREZAS E PADRÕES INTERNOS OBTIDO ATRAVÉS DO USO DA COLUNA XBRIDGE C8 (50 x 2,1 mm, 5 μ m) E FASE MÓVEL (A) ÁGUA E (B) ACETONITRILA/ÁGUA (95:5 v/v), AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO E 3 mmol.L⁻¹ DE FORMIATO DE AMÔNIO, ELUÍDA NO MODO GRADIENTE.

NOTA: ALB: albendazol; EPR: eprinomectina; FEB: febantel; ICF: impureza C febantel; IAP: impureza A praziquantel; IBP: impureza B praziquantel; ICP: impureza C praziquantel; IVE: ivermectina; PIR: pirantel; PRA: praziquantel; Temperatura de forno: 20°C; Volume de injeção: 20 μ l.

Novamente o modo de eluição isocrático foi considerado para o desenvolvimento do método, porém aumentando a proporção de orgânico para 90%. Conforme apresentado na Figura 18, com essa proporção uma melhora significativa no tempo de retenção da ivermectina foi observada, possibilitando uma corrida de 3,50 minutos. Além de tudo um bom perfil dos picos cromatográficos foi observado para todos os analitos. A velocidade de aquisição dos dados (*Dwell time*) calculada foi de 150 ms para todos os íons monitorados.

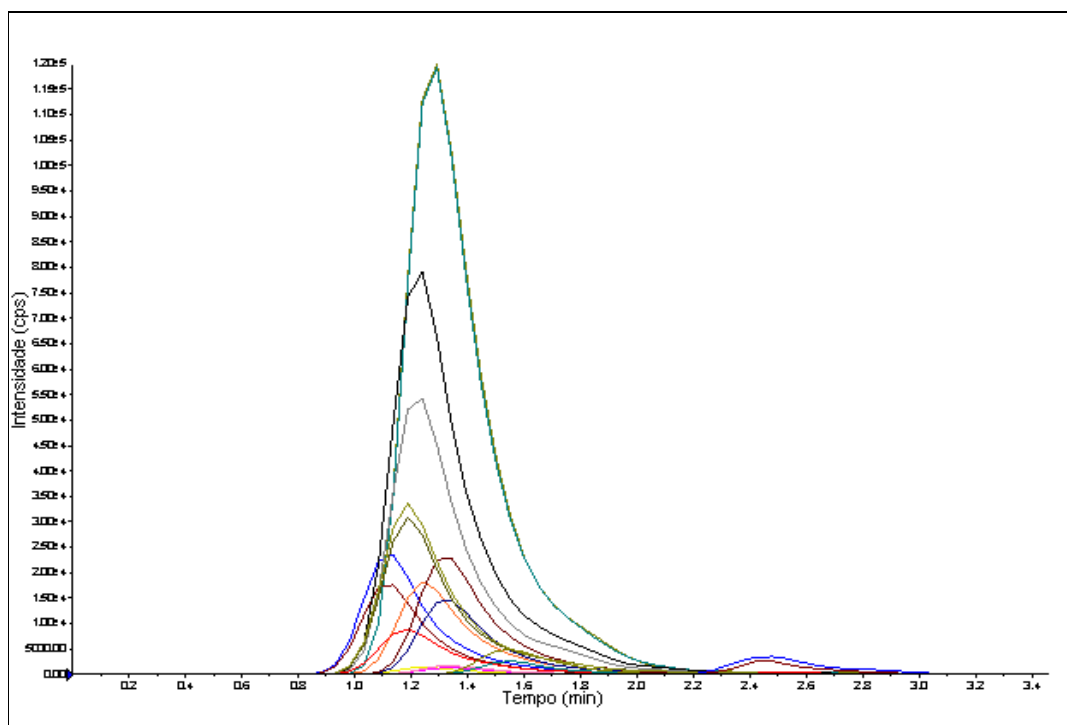


FIGURA 18 - CROMATOGRAMA DOS FARMACOS, IMPUREZAS E PADRÕES INTERNOS OBTIDO ATRAVÉS DO USO DA COLUNA XBRIDGE C8 (50 x 2,1 mm, 5 μ m) E FASE MÓVEL 10:90 v/v DE ÁGUA E ACETONITRILA/ÁGUA (95:5 v/v), AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO E 3 mmol.L⁻¹ DE FORMIATO DE AMÔNIO, ELUÍDA NO MODO ISOCRÁTICO.

NOTA: Temperatura de forno: 20 °C; Volume de injeção: 20 μ l.

Em virtude da excelente otimização cromatográfica obtida, o método foi validado segundo os critérios descritos na Resolução – RE n° 899, de 29 de março de 2003, ANVISA, categoria I que dispõe sobre testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas (BRASIL, 2003a).

4.2.3 Teste de carry over

No ensaio de *carry over* foram avaliadas, separadamente, duas misturas de solventes (acetonitrila/metanol e água/metanol, ambas 50:50 v/v) para limpeza da seringa do injetor automático. Para isso foi preparada uma solução de trabalho contendo os fármacos e padrões internos e uma solução do branco. De modo a avaliar cada mistura de solvente/solução de limpeza, foi realizada a injeção da solução de trabalho e, logo em seguida, da solução do branco no CLAE-EM/EM.

Como resultado foi observado que a solução água:metanol (50:50 v/v) não promoveu a limpeza adequada da seringa, pois resíduos dos fármacos e padrões internos apareceram no branco. Por sua vez, a solução acetonitrila/metanol (50:50 v/v) promoveu uma efetiva limpeza da seringa, visto que nenhum resíduo foi evidenciado no branco (Figura 19).

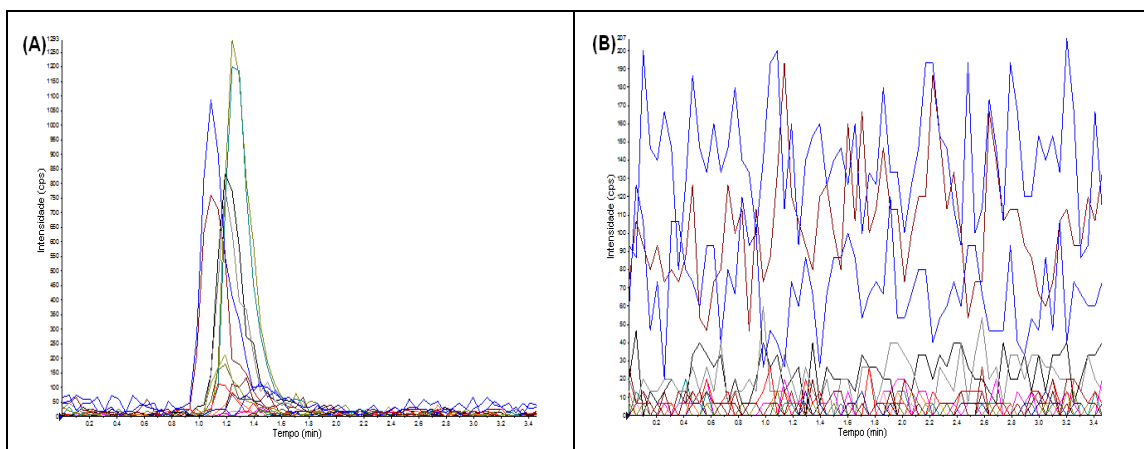


FIGURA 19 – CROMATOGRAMAS DAS SOLUÇÕES DO BRANCO AO UTILIZAR A SOLUÇÃO DE LIMPEZA ÁGUA:METANOL 50:50 v/v (A) E ACETONITRILA:METANOL 50:50 v/v (B) NA LIMPEZA DA SERINGA DO INJETOR AUTOMÁTICO

Em virtude do excelente resultado obtido com a solução acetonitrila/metanol (50:50 v/v), foi programado para o injetor automático realizar duas vezes a lavagem da seringa com essa solução antes de cada injeção. Além disso, ficou definida a aplicação de um branco entre cada amostra, reduzindo ainda mais a possibilidade de *carry over*.

4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM/EM

4.3.1 Seletividade

O espectrômetro de massas é considerado um equipamento de alta seletividade. Dessa forma, picos que eluem próximos podem ser claramente distinguidos baseados nos diferentes íons precursores e íons produtos.

Apesar da alta seletividade do espectrômetro de massas, amostras contendo diferentes placebos foram preparadas e analisadas por CLAE-EM/EM a fim de observar alguma possível interferência nos tempos de retenção dos analitos e padrões internos. Conforme demonstrado na Figura 20, não houve nenhum pico de interferência durante a corrida cromatográfica, sendo portanto o método considerado seletivo.

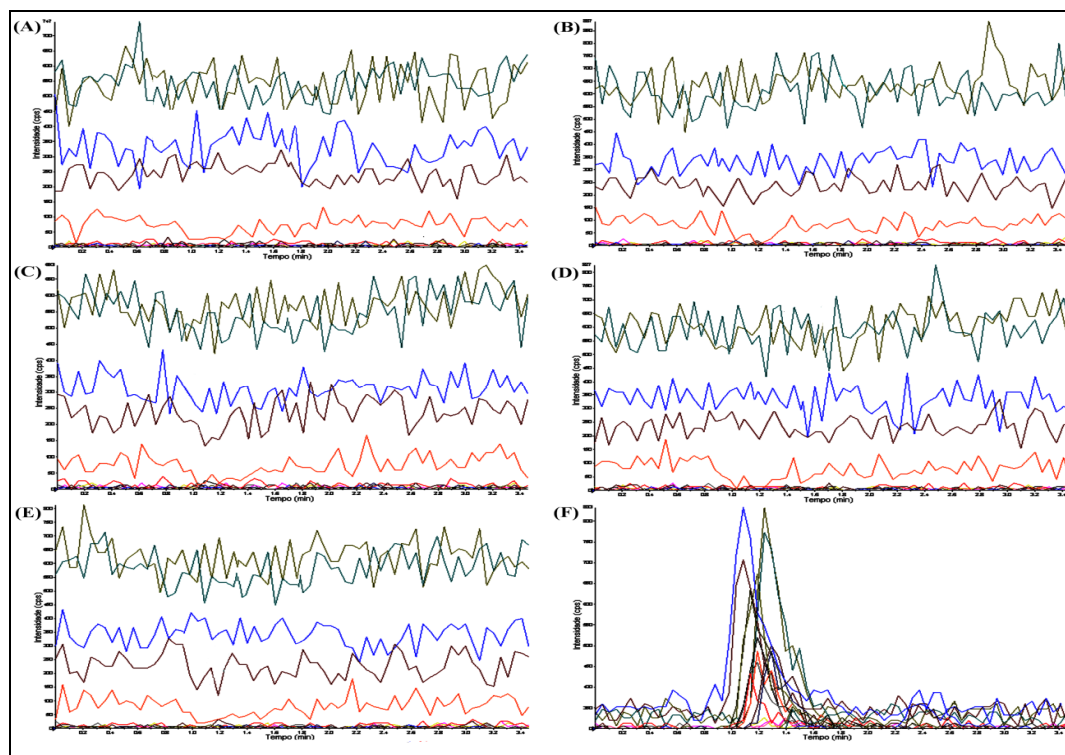


FIGURA 20 – CROMATOGRAMAS DOS PLACEBOS (A), (B), (C), (D), (E) E DA MISTURA DE PADRÕES ANALÍTICOS (F) NO ENSAIO DE SELETIVIDADE

NOTA: Mistura de padrões analíticos (F) contendo 0,25 ng.mL⁻¹ de febantel, albendazol, impureza C do febantel e impureza A do praziquantel, 0,50 ng.mL⁻¹ de praziquantel, pamoato de pirantel e impureza B de praziquantel, 5,00 ng.mL⁻¹ de ivermectina, eprinomectina e impureza C de praziquantel utilizando como diluente a fase móvel (seção 3.3.1, pág. 73).

4.3.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Tanto o limite de detecção (LD) quanto o limite de quantificação (LQ) foram estimados a partir da relação sinal/ruído. O LD foi baseado na relação de pelo menos três vezes a altura do ruído da linha base enquanto que o LQ de no mínimo 10 vezes. Os resultados demonstraram que o método apresenta uma alta sensibilidade devido aos baixos valores de LD e LQ (Tabela 19).

TABELA 19 – RESULTADO DOS LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ANALITOS EM CLAE-EM/EM

Analitos	Parâmetro de validação	Concentração (ng.mL ⁻¹)	Sinal / ruído
Febantel	LD	0,05	3,30
	LQ	0,10	10,60
Pirantel	LD	0,10	3,50
	LQ	0,25	10,70
Praziquantel	LD	0,10	4,10
	LQ	0,25	10,30
Ivermectina	LD	1,00	3,30
	LQ	2,50	10,40
Impureza C Febantel	LD	0,05	3,40
	LQ	0,10	12,70
Impureza A Praziquantel	LD	0,05	4,60
	LQ	0,10	10,10
Impureza B Praziquantel	LD	0,10	5,00
	LQ	0,25	13,60
Impureza C Praziquantel	LD	0,50	3,70
	LQ	2,50	16,00

4.3.3 Linearidade

A linearidade foi determinada em seis níveis de concentração, contemplando as faixas de 20 a 100 ng.mL⁻¹ para o febantel e pamoato de pirantel, 6 a 30 ng.mL⁻¹ para o praziquantel e 40 a 200 ng.mL⁻¹ para ivermectina. A linearidade das impurezas não foi determinada, visto que o limite máximo estabelecido é muito próximo do limite de quantificação.

As curvas de calibração foram construídas automaticamente pelo software Analyst versão 1.4.2, plotando as áreas dos analitos / área do padrão interno *versus* a concentração dos analitos / concentração do padrão interno. A linearidade foi obtida através da análise de regressão linear 1/X a qual foi calculada através do método dos quadrados mínimos. As curvas de regressão do febantel, pamoato de pirantel, praziquantel e ivermectina estão ilustradas nos Gráficos 3, 4, 5 e 6.

Para todos os analitos e em todos os níveis de concentração as variações de precisão e exatidão foram menores do que 10% (Tabela 20), resultado este considerado satisfatório tendo em vista que variações maiores são esperadas para o detector de massas ($\pm 15\%$). Além disso, coeficientes de regressão superiores a 0,99 indicaram uma grande eficiência da regressão. Sob todos os aspectos a análise de variância indicou que o ajuste do modelo linear é satisfatório para todas as curvas, pois os valores de p encontrados foram muito menores do que o valor de F crítico, indicando que as variâncias em y são independentes dos níveis de concentração em x. Além de tudo, os valores de F observado na análise de validade de regressão foram consideravelmente maiores que o F crítico, indicando a existência de relação linear entre as variáveis x e y (CHUI; ZUCCHINI; LICHTIG, 2001) (Tabelas 21, 22, 23 e 24).

Em virtude dos bons resultados obtidos, pode-se inferir que dentro das faixas de concentração estabelecidas, o método desenvolvido garante uma resposta linear precisa e exata para todos os analitos.

TABELA 20 - VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS NO ESTUDO DA LINEARIDADE

Analitos	Concentração esperada (ng.mL ⁻¹)	Concentração determinada (ng.mL ⁻¹)	Desvio padrão	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
Febantel	20,00	20,25	1,164	5,72	101,25
	40,00	39,53	0,916	2,30	98,84
	50,00	49,42	0,204	0,41	98,85
	60,00	60,09	1,653	2,73	100,15
	80,00	81,22	2,420	2,96	101,53
	100,00	99,07	0,375	0,37	99,07
Pirantel	20,00	20,57	0,917	4,39	102,85
	40,00	39,26	1,078	2,70	98,14
	50,00	49,41	0,636	1,27	98,83
	60,00	59,32	2,207	3,66	98,87
	80,00	79,93	2,920	3,59	99,91
	100,00	101,11	1,578	1,53	101,11
Praziquantel	6,00	6,15	0,384	6,13	102,54
	12,00	11,79	0,135	1,12	98,31
	15,00	14,67	0,251	1,68	97,83
	18,00	18,02	0,377	2,06	100,16
	24,00	24,08	0,931	3,80	100,35
	30,00	30,34	0,621	2,01	101,14
Ivermectina	40,00	39,06	3,549	7,70	97,65
	80,00	84,69	6,297	6,30	105,87
	100,00	96,01	6,616	5,84	96,01
	120,00	120,96	9,332	6,52	100,80
	160,00	159,15	16,654	8,86	99,47
	200,00	199,61	12,767	5,42	99,80

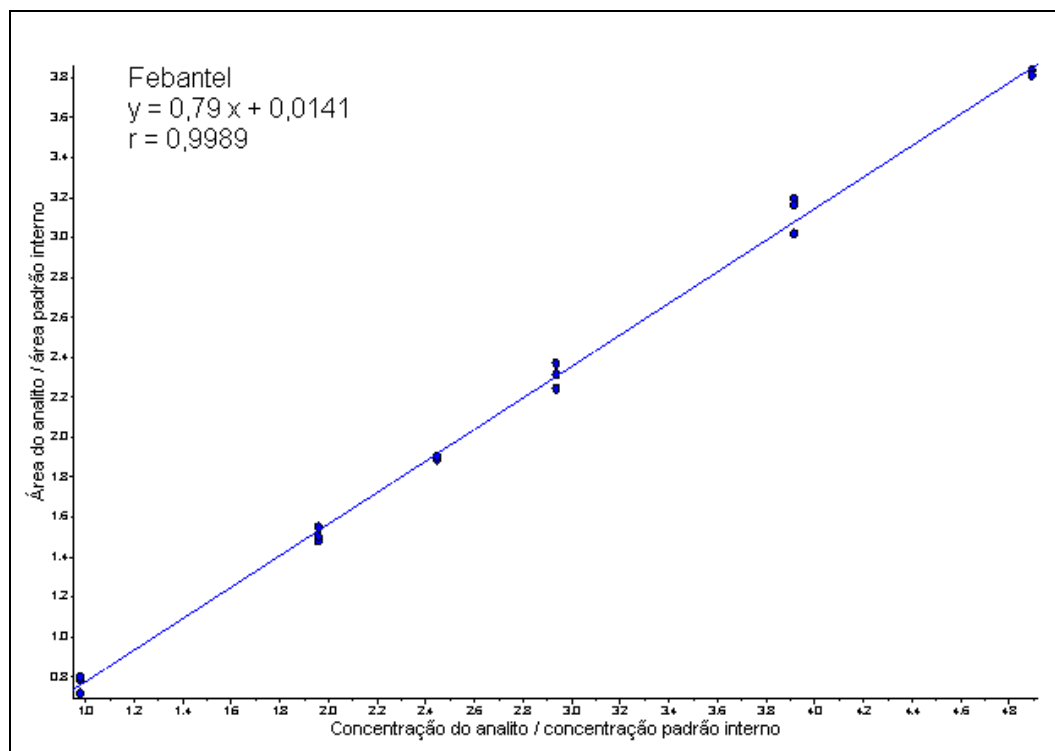


GRÁFICO 3 - LINEARIDADE DO FEBANTEL OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM.

TABELA 21 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DE FEBANTEL

Fonte da variação	SQ	gl	QM	F obs	p	F crítico
Entre grupos	$1,19 \times 10^{14}$	1	$1,19 \times 10^{14}$	94,66	$2,34 \times 10^{-11}$	4,13
Dentro dos grupos	$4,26 \times 10^{13}$	34	$1,25 \times 10^{12}$			
Total	$1,61 \times 10^{14}$	35				

NOTA: SQ - soma de quadrados; gl - grau de liberdade; QM - quadrado médio; F - teste de variâncias; F obs – F observado; F crítico – F critico para nível de 5% de probabilidade; p: probabilidade para a hipótese de nulidade.

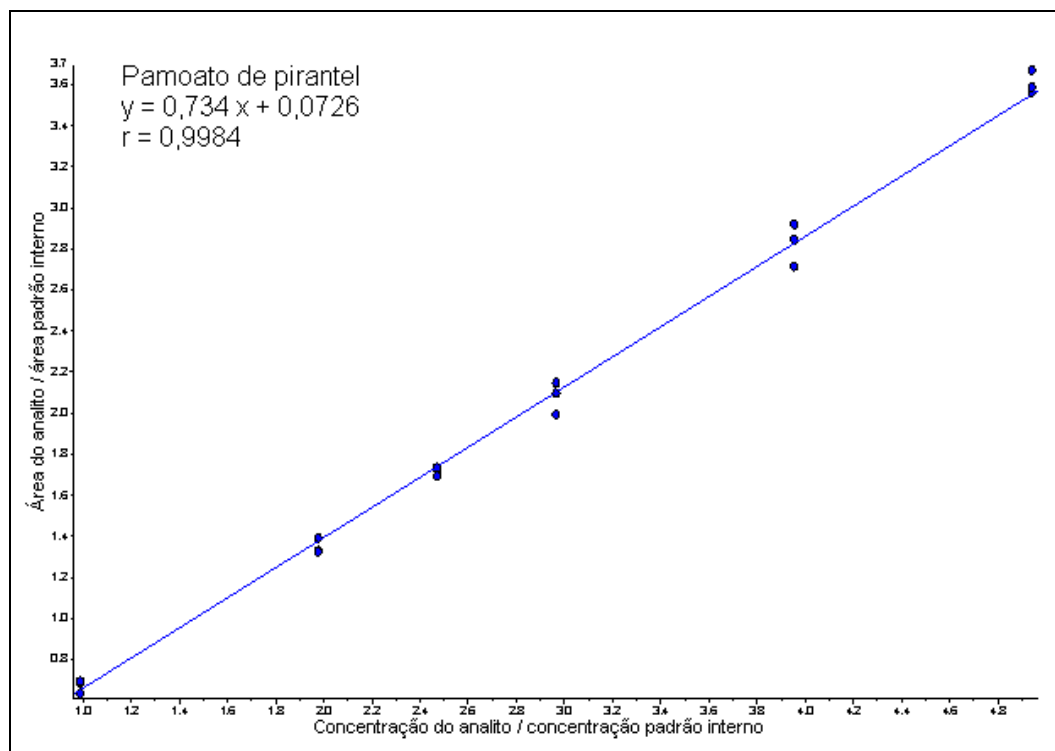


GRÁFICO 4 - LINEARIDADE DO PAMOATO DE PIRANTEL OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM.

TABELA 22 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DO PAMOATO DE PIRANTEL

Fonte da variação	SQ	gl	QM	F obs	p	F crítico
Entre grupos	$9,83 \times 10^{13}$	1	$9,83 \times 10^{13}$	87,12	$6,62 \times 10^{-11}$	4,13
Dentro dos grupos	$3,84 \times 10^{13}$	34	$1,13 \times 10^{12}$			
Total	$1,37 \times 10^{14}$	35				

NOTA: SQ - soma de quadrados; gl - grau de liberdade; QM - quadrado médio; F - teste de variâncias; F obs – F observado; F crítico – F crítico para nível de 5% de probabilidade; p: probabilidade para a hipótese de nulidade.

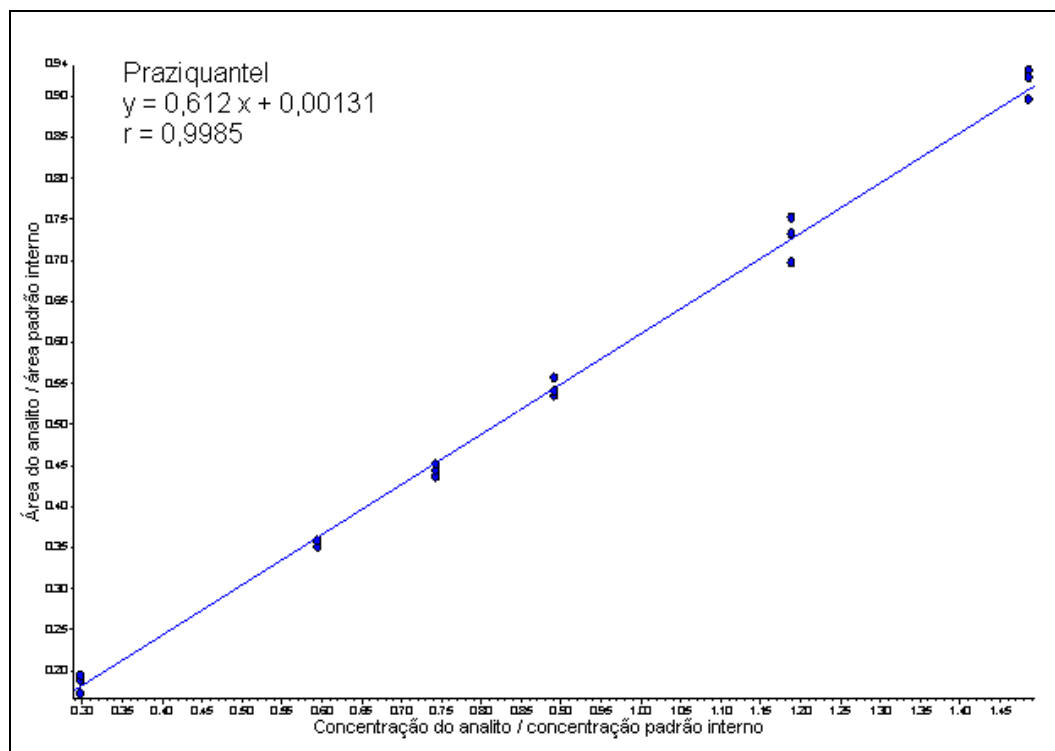


GRÁFICO 5 - LINEARIDADE DO PRAZICUANTEL OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM.

TABELA 23 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DE PRAZICUANTEL

Fonte da variação	SQ	gl	QM	F obs	p	F crítico
Entre grupos	$6,62 \times 10^{12}$	1	$6,62 \times 10^{12}$	93,36	$2,79 \times 10^{-11}$	4,13
Dentro dos grupos	$2,41 \times 10^{12}$	34	$7,09 \times 10^{10}$			
Total	$9,03 \times 10^{12}$	35				

NOTA: SQ - soma de quadrados; gl - grau de liberdade; QM - quadrado médio; F - teste de variâncias; F obs – F observado; F crítico – F critico para nível de 5% de probabilidade; p: probabilidade para a hipótese de nulidade.

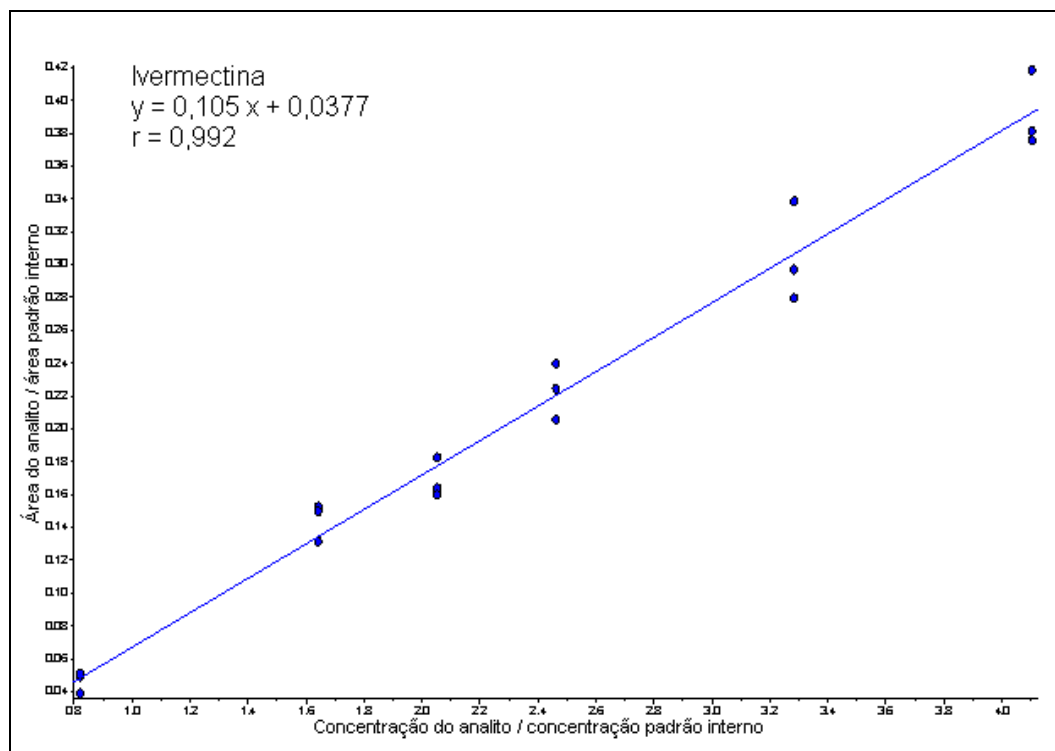


GRÁFICO 6 - LINEARIDADE DA IVERMECTINA OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM.

TABELA 24 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DE IVERMECTINA

Fonte da variação	SQ	gl	QM	F obs	p	F crítico
Entre grupos	$1,02 \times 10^9$	1	$1,02 \times 10^9$	66,61	$1,61 \times 10^{-9}$	4,13
Dentro dos grupos	$5,23 \times 10^8$	34	$1,54 \times 10^7$			
Total	$1,55 \times 10^9$	35				

NOTA: SQ - soma de quadrados; gl - grau de liberdade; QM - quadrado médio; F - teste de variâncias; F obs – F observado; F crítico – F critico para nível de 5% de probabilidade; p: probabilidade para a hipótese de nulidade.

4.3.4 Intervalo de trabalho

A concentração teste foi definida a partir do ponto central da curva e o intervalo de trabalho de 80 a 120% dessa concentração. Os intervalos definidos foram: 40, 50 e 60 ng.mL⁻¹ para o febantel e pamoato de pirantel, 12, 15 e 18 ng.mL⁻¹ para o praziquantel e 80, 100 e 120 ng.mL⁻¹ para a ivermectina.

4.3.5 Precisão

4.3.5.1 Repetitividade

A repetitividade foi realizada em triplicata, contemplando um único nível de concentração para os padrões internos e três níveis de concentração para os fármacos, abrangendo 80, 100 e 120 % da concentração teste. Para todos os analitos foram observadas variações menores do que 5% dentre as réplicas dos diferentes níveis de concentração avaliados. Além disso, o valor de p ficou superior a 0,05 para todos os analitos e concentrações, indicando que as médias comparadas são estatisticamente iguais (Tabela 25).

TABELA 25 – VALORES DE DESVIO PADRÃO RELATIVO OBTIDOS ATRAVÉS DAS MÉDIAS DAS ÁREAS NO ENSAIO DE REPETITIVIDADE

Analitos	Concen. (ng.mL ⁻¹)	Período 1 Áreas ± DP	Período 2 Áreas ± DP	Média ± DP	Valor de p*	DPR (%)
Febantel	40	2076666,7 ± 25166,1	2066666,7 ± 47258,2	2071666,7 ± 7071,1	0,76	± 0,34
		2606666,7 ± 25166,1	2583333,3 ± 40414,5	2595000,0 ± 16499,2	0,44	± 0,64
	50	3006666,7 ± 66583,3	2996666,7 ± 46188,0	3001666,7 ± 7071,1	0,84	± 0,24
	60	1513333,3 ± 41633,3	1560000,0 ± 30000,0	1536666,7 ± 32998,3	0,19	± 2,15
		1880000,0 ± 65574,4	1876666,7 ± 49328,8	1878333,3 ± 2357,0	0,95	± 0,13
	60	2223333,3 ± 40414,5	2196666,7 ± 61101,0	2210000,0 ± 18856,2	0,56	± 0,85
Pamoato de pirantel	12	82333,3 ± 2706,2	85566,7 ± 2400,7	83950,0 ± 2286,3	0,20	± 2,72
		101700,0 ± 2251,7	106000,0 ± 3000,0	103850,0 ± 3040,6	0,12	± 2,93
	15	123666,7 ± 4932,9	124333,3 ± 3511,9	124000,0 ± 471,4	0,86	± 0,38
	80	16566,7 ± 305,5	17200,0 ± 854,4	16883,3 ± 447,8	0,29	± 2,65
		20533,3 ± 750,6	19566,6 ± 351,2	20050,0 ± 683,5	0,11	± 3,41
	100	25833,3 ± 1270,2	24900,0 ± 854,4	25366,7 ± 660,0	0,35	± 2,60
Ivermectina	120	232000,0 ± 3605,6	237000,0 ± 10440,3	234500,0 ± 3535,5	0,48	± 1,51
	20	57866,7 ± 1266,2	58966,7 ± 850,5	58416,7 ± 777,8	0,28	± 1,33
Albendazol	50					
Eprinomectina						

NOTA: n = 3; * = nível de confiança de 95% para o teste t de Student

4.3.5.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi realizada nos mesmos níveis de concentração do ensaio de repetibilidade, porém com analista diferente e em dias diferentes. Os valores de desvio padrão relativo (DPR) obtidos nesse ensaio estão apresentados na Tabela 26.

TABELA 26 – VALORES DE DESVIO PADRÃO RELATIVO OBTIDOS ATRAVÉS DAS MÉDIAS DAS ÁREAS NO ENSAIO DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Analitos	Concen. (ng.mL ⁻¹)	Analista 1 Áreas ± DP	Analista 2 Áreas ± DP	Média ± DP	Valor de p*	DPR (%)
Febantel	40	2066666,7 ± 47258,2	2143333,3 ± 25166,1	2105000,0 ± 54211,5	0,07	± 2,58
	50	2583333,3 ± 40414,5	2530000,0 ± 34641,0	2568333,3 ± 54211,5	0,16	± 1,48
	60	2996666,7 ± 46188,0	3050000,0 ± 10000,0	3023333,3 ± 37712,4	0,19	± 1,25
Pamoato de pirantel	40	1560000,0 ± 30000,0	1530000,0 ± 34641,0	1545000,0 ± 21213,2	0,32	± 1,37
	50	1876666,7 ± 49328,8	1933333,3 ± 23094,0	1905000,0 ± 40069,4	0,14	± 2,10
	60	2196666,7 ± 61101,0	2283333,3 ± 25166,1	2240000,0 ± 61282,6	0,08	± 2,74
Praziquantel	12	85566,7 ± 2400,7	88100,0 ± 2116,6	85216,7 ± 4077,6	0,24	± 2,06
	15	106000,0 ± 3000,0	106666,7 ± 577,4	104183,3 ± 3512,0	0,74	± 0,44
	18	124333,3 ± 3511,9	118333,3 ± 3055,1	121333,3 ± 4242,6	0,09	± 3,50
Ivermectina	80	17200,0 ± 854,4	16400,0 ± 435,9	16800,0 ± 565,7	0,22	± 3,37
	100	19566,7 ± 351,2	20500,0 ± 529,2	20033,3 660,0	0,06	± 3,29
	120	24900,0 ± 854,4	26500,0 ± 700,0	25700,0 ± 1131,4	0,07	± 4,40
Albendazol	20	237000,0 ± 10440,3	224333,3 ± 8082,9	230666,7 ± 8956,7	0,17	± 3,88
Eprinomectina	50	58966,7 ± 850,5	57933,3 ± 665,8	58450,0 ± 730,7	0,17	± 1,25

NOTA: n = 3; * = nível de confiança de 95% para o teste t de Student

Em virtude das pequenas variações encontradas tanto no ensaio de repetitividade quanto na precisão intermediária ($DPR < 5\%$) e entre as médias de cada analito nos respectivos ensaios ($p > 0,05$), o método foi considerado preciso.

4.3.6 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método da adição de padrão. Para isso, uma amostra de comprimido foi triturada, diluída e analisada por CLAE-EM/EM, sendo as áreas de cada analito registradas. Posteriormente foi preparada uma nova solução com a amostra dos comprimidos, porém fortificada em um único nível de concentração para os padrões internos e em três níveis de concentração para os fármacos (seção 3.4.5, pág. 80). A porcentagem de recuperação foi calculada por meio da razão entre a concentração média experimental (área sem fortificação subtraída da área fortificada) e a concentração teórica do teste, obtida com os padrões analíticos nos respectivos níveis de concentração.

Conforme demonstrado na Tabela 27, valores satisfatórios de exatidão ($> 93,3\%$) foram obtidos para todos os fármacos e padrões internos. Portanto, o método foi considerado exato.

TABELA 27 – RESULTADOS DO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO OBTIDOS EM CLAE-EM/EM PELO MÉTODO DA ADIÇÃO DO PADRÃO

Analito	Concen. (ng.mL ⁻¹)	Área teórica (média ± DP)	Intervalo de confiança*	Amostra (Área ± DP)	Amostra fortificada (Área ± DP)	Área recuperada (média)	Exatidão (%) ± DP
Febantel	40	198666,7 ± 90185,0	1762634,7 – 2210698,6		355333,3 ± 81445,3	1896666,7	95,5 ± 2,9
	50	232000,0 ± 78102,5	2125982,6 – 2514017,4	1656666,7 ± 30550,5	3970000,0 ± 183303,0	2313333,3	99,7 ± 4,3
	60	290000,0 ± 113578,2	2617856,2 – 3182143,8		4470000,0 ± 155884,6	2813333,3	97,0 ± 3,4
Pamoato de pirantel	40	1450000,0 ± 62450,0	1294865,6 – 1605134,4		2083333,3 ± 77674,5	1469666,7	101,4 ± 2,4
	50	1640000,0 ± 30000,0	1565475,9 – 1714524,1	613666,7 ± 3214,6	2230000,0 ± 105830,1	1616333,3	98,6 ± 4,6
	60	2000000,0 ± 26457,5	1934275,9 – 2065724,1		2603333,3 ± 106926,8	1989666,7	99,5 ± 4,6
Praziquantel	12	86066,7 ± 1222,0	83031,0 – 89102,3		163333,3 ± 4618,8	86700,0	100,7 ± 4,3
	15	111666,7 ± 5033,2	99163,4 – 124169,9	76633,3 ± 1530,8	189666,7 ± 4041,5	113033,3	101,2 ± 2,0
	18	140666,7 ± 2516,6	134415,1 – 146918,3		213000,0 ± 5291,5	136366,7	96,9 ± 3,7
Ivermectina	80	15833,3 ± 475,2	14652,8 – 17031,8		14766,7 ± 472,6	14766,7	93,3 ± 1,0
	100	17033,2 ± 814,5	15010,1 – 19056,5	Zero	16516,7 ± 637,1	16516,7	97,0 ± 3,5
	120	20966,7 ± 852,0	18850,3 – 23083,0		20000,0 ± 785,8	20000,0	95,4 ± 5,0
Albendazol	20	269000,0 ± 5000,0	256579,3 – 281420,7	Zero	263000,0 ± 4358,9	263000,0	97,8 ± 3,4
Eprinomectina	50	57033,3 ± 808,3	55025,4 – 59041,2	Zero	55800,0 ± 871,8	55800,0	97,8 ± 1,1

NOTA: *Nível de confiança de 95%; n = 3

4.3.7 Robustez

Para realização do ensaio de robustez, soluções de trabalho contendo 15 ng.mL^{-1} de praziquantel, 20 ng.mL^{-1} de albendazol, 100 ng.mL^{-1} de ivermectina e 50 ng.mL^{-1} de febantel, pamoato de pirantel e eprinomectina, foram preparadas em sextuplicata e analisadas na condição otimizada (nominal) e modificada do método. Os valores de áreas obtidos nas diferentes condições foram comparados com aqueles obtidos na condição nominal através das ferramentas estatísticas Teste F e Teste t. Os resultados do ensaio de robustez estão descritos nas Tabelas 28, 29, 30, 31, 32 e 33.

O ensaio de robustez indicou que modificações na proporção de ácido fórmico podem comprometer a exatidão dos resultados da ivermectina e do albendazol ($p < 0,05$). Porém para a eprinomectina, somente o aumento na proporção de ácido fórmico foi significativo ($p = 1,64 \times 10^{-8}$). Em relação ao formiato de amônio, pequenas modificações frente a sua concentração de uso comprometeram a exatidão de todos os analitos ($p < 0,05$).

Modificações na proporção de fase móvel, por sua vez, não foram capazes de comprometer a exatidão dos resultados do febantel e do praziquantel ($p > 0,05$). Porém, para os demais analitos foi verificado que modificações deliberadas na sua proporção podem ser críticas.

Pequenas variações na temperatura da coluna também foram críticas para a eprinomectina ($p < 0,05$), mas não foram significativas para alterar a exatidão do febantel e do praziquantel ($p > 0,05$). Quanto ao albendazol e pamoato de pirantel, o fator crítico foi a redução da temperatura ($p = 7,08 \times 10^{-5}$ e $7,45 \times 10^{-4}$, respectivamente), ao contrário da ivermectina que foi mais sensível ao aumento de temperatura ($p = 5,24 \times 10^{-7}$).

Por fim, as modificações propostas no fluxo da fase móvel não demonstraram significância nos valores de exatidão do praziquantel e do pamoato de pirantel ($p > 0,05$), diferentemente da eprinomectina e do albendazol ($p < 0,05$), os quais demonstraram ser mais suscetíveis a essas alterações. Em relação a ivermectina e ao febantel, apenas a redução do fluxo comprometeu a exatidão dos seus resultados ($p = 7,46 \times 10^{-3}$ e $6,71 \times 10^{-4}$, respectivamente).

Como conclusão, todas as modificações propostas foram críticas para um ou outro analito e, portanto, para que resultados confiáveis sejam obtidos, as condições do método não devem ser modificadas. É importante mencionar que esses resultados não invalidam o método, mas sim dizem quais são os cuidados que o operador deve ter durante o seu uso.

TABELA 28 – RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ PARA O FEBANTEL

Parâmetro modificado	Condições	Área (média ± DP)	Teste t de Student (valor de p*)
Ácido fórmico (%)	0,09	2048333 ± 74944,4	0,03
	0,10	2133333 ± 28047,6	1,00
	0,11	2095000 ± 75033,3	0,27
Formiato de amônio (mmol.L ⁻¹)	2,90	1818333 ± 47504,4	6,83 x 10 ⁻⁸
	3,00	2133333 ± 28047,6	1,00
	3,10	1950000 ± 37416,6	2,30 x 10 ⁻⁶
Proporção de fase móvel (%)	9:91	2150000 ± 76941,5	0,82
	10:90	2141667 ± 46224,1	1,00
	11:89	2156667 ± 52788,9	0,61
Temperatura da coluna (°C)	18	2130000 ± 73756,4	0,75
	20	2141667 ± 46224,1	1,00
	22	2181667 ± 87730,6	0,35
Fluxo de fase móvel (µL.min ⁻¹)	198	2286667 ± 56803,8	6,71 x 10 ⁻⁴
	200	2141667 ± 46224,1	1,00
	202	2190000 ± 82462,1	0,24

NOTA: n=6; * = nível de confiança de 95%

TABELA 29 – RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ PARA O PAMOATO DE PIRANTEL

Parâmetro modificado	Condições	Área (média ± DP)	Teste t de Student (valor de p*)
Ácido fórmico (%)	0,09	2125000 ± 63796,5	0,03
	0,10	2233333 ± 82138,1	1,00
	0,11	2188333 ± 92394,1	0,39
Formiato de amônio (mmol.L ⁻¹)	2,90	1995000 ± 29495,8	5,44 x 10 ⁻⁵
	3,00	2233333 ± 82138,1	1,00
	3,10	2018333 ± 46224,1	2,32 x 10 ⁻⁴
Proporção de fase móvel (%)	9:91	1968333 ± 40702,2	1,83 x 10 ⁻⁶
	10:90	2161667 ± 25625,5	1,00
	11:89	1998333 ± 53447,8	5,04 x 10 ⁻⁵
Temperatura da coluna (°C)	18	2015000 ± 70639,9	7,45 x 10 ⁻⁴
	20	2161667 ± 25625,5	1,00
	22	2133333 ± 36696,9	0,15
Fluxo de fase móvel (µL.min ⁻¹)	198	2116667 ± 63456,0	0,14
	200	2161667 ± 25625,5	1,00
	202	2125000 ± 39370,0	0,08

NOTA: n=6; * = nível de confiança de 95%

TABELA 30 – RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ PARA O PRAZQUANTEL

Parâmetro modificado	Condições	Área (média ± DP)	Teste t de Student (valor de p*)
Ácido fórmico (%)	0,09	97566,7 ± 4071,7	0,72
	0,10	98416,7 ± 3807,1	1,00
	0,11	99033,3 ± 4713,7	0,81
Formiato de amônio (mmol.L ⁻¹)	2,90	91016,7 ± 3035,4	3,96 x 10 ⁻³
	3,00	98416,7 ± 3807,1	1,00
	3,10	91050,0 ± 2805,5	3,40 x 10 ⁻³
Proporção de fase móvel (%)	9:91	115666,7 ± 3444,8	0,09
	10:90	119666,7 ± 3829,7	1,00
	11:89	119500,0 ± 4037,3	0,94
Temperatura da coluna (°C)	18	117833,3 ± 5741,7	0,53
	20	119666,7 ± 3829,7	1,00
	22	121666,7 ± 4457,2	0,42
Fluxo de fase móvel (µL.min ⁻¹)	198	118166,7 ± 2316,6	0,43
	200	119666,7 ± 3829,7	1,00
	202	114333,3 ± 4885,3	0,06

NOTA: n=6; * = nível de confiança de 95%

TABELA 31 – RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ PARA A IVERMECTINA

Parâmetro modificado	Condições	Área (média ± DP)	Teste t de Student (valor de p*)
Ácido fórmico (%)	0,09	8451,7 ± 419,0	1,67 x 10 ⁻⁶
	0,10	10433,3 ± 250,3	1,00
	0,11	4101,7 ± 189,5	2,79 x 10 ⁻¹³
Formiato de amônio (mmol.L ⁻¹)	2,90	13300,0 ± 517,7	2,48 x 10 ⁻⁷
	3,00	10433,3 ± 250,3	1,00
	3,10	19600,0 ± 619,7	1,29 x 10 ⁻¹¹
Proporção de fase móvel (%)	9:91	26766,7 ± 637,7	8,22 x 10 ⁻¹⁰
	10:90	18066,7 ± 725,7	1,00
	11:89	19566,7 ± 637,7	3,47 x 10 ⁻³
Temperatura da coluna (°C)	18	18900,0 ± 869,5	0,10
	20	18066,7 ± 725,7	1,00
	22	24133,3 ± 1100,3	5,24 x 10 ⁻⁷
Fluxo de fase móvel (µL.min ⁻¹)	198	16650,0 ± 742,3	7,46 x 10 ⁻³
	200	18066,7 ± 725,7	1,00
	202	17416,7 ± 598,1	0,12

NOTA: n=6; * = nível de confiança de 95%

TABELA 32 – RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ PARA O ALBENDAZOL

Parâmetro modificado	Condições	Área (média ± DP)	Teste t de Student (valor de p*)
Ácido fórmico (%)	0,09	273166,7 ± 8400,4	2,06 x 10 ⁻³
	0,10	289500,0 ± 4847,7	1,00
	0,11	266833,3 ± 3544,9	3,25 x 10 ⁻⁶
Formiato de amônio (mmol.L ⁻¹)	2,90	248333,3 ± 8213,8	9,52 x 10 ⁻⁷
	3,00	289500,0 ± 4847,7	1,00
	3,10	250666,7 ± 5006,7	8,63 x 10 ⁻⁸
Proporção de fase móvel (%)	9:91	303500,0 ± 7893,0	5,15 x 10 ⁻³
	10:90	325833,3 ± 13166,9	1,00
	11:89	277833,3 ± 10496,0	3,79 x 10 ⁻⁵
Temperatura da coluna (°C)	18	285166,7 ± 7935,2	7,08 x 10 ⁻⁵
	20	325833,3 ± 13166,9	1,00
	22	315000,0 ± 13023,1	0,18
Fluxo de fase móvel (µL.min ⁻¹)	198	295666,7 ± 4226,9	3,27 x 10 ⁻⁴
	200	325833,3 ± 13166,9	1,00
	202	287333,3 ± 7501,1	9,48 x 10 ⁻⁵

NOTA: n=6; * = nível de confiança de 95%

TABELA 33 – RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ PARA A EPRINOMECTINA

Parâmetro modificado	Condições	Área (média ± DP)	Teste t de Student (valor de p*)
Ácido fórmico (%)	0,09	47166,7 ± 2261,6	0,37
	0,10	48266,7 ± 1794,1	1,00
	0,11	32466,7 ± 1571,8	1,64 x 10 ⁻⁸
Formiato de amônio (mmol.L ⁻¹)	2,90	60416,7 ± 2207,6	1,05 x 10 ⁻⁶
	3,00	48266,7 ± 1794,1	1,00
	3,10	70883,3 ± 1688,1	6,80 x 10 ⁻¹⁰
Proporção de fase móvel (%)	9:91	57500,0 ± 309,8	1,51 x 10 ⁻²
	10:90	54716,7 ± 2308,6	1,00
	11:89	50933,3 ± 2149,1	1,48 x 10 ⁻²
Temperatura da coluna (°C)	18	41666,7 ± 1610,8	4,90 x 10 ⁻⁷
	20	54716,7 ± 2308,6	1,00
	22	49483,3 ± 1548,4	9,63 x 10 ⁻⁴
Fluxo de fase móvel (µL.min ⁻¹)	198	46966,7 ± 2326,9	1,75 x 10 ⁻⁴
	200	54716,7 ± 2308,6	1,00
	202	38533,3 ± 1811,8	9,53 x 10 ⁻⁸

NOTA: n=6; * = nível de confiança de 95%

4.3.8 Teste de estabilidade

4.3.8.1 Estabilidade das soluções estoque

A estabilidade foi avaliada através da comparação das áreas das amostras recém-preparadas com aquelas obtidas após um, sete e 30 dias de armazenamento a 4 °C e temperatura ambiente. Como critério de aceitação, foi considerada estável a solução que não apresentou diferença em relação à média das áreas obtidas com a média das áreas das amostras recém-preparadas.

Conforme apresentado na Tabela 34 e nos Gráficos 7 e 8, após um dia de armazenamento em refrigerador (4 °C) todos os analitos permaneceram estáveis ($p > 0,05$). Uma boa estabilidade também foi alcançada para a metade dos compostos após sete dias de armazenamento ($p > 0,05$), exceto para o febantel, impureza C do febantel e as impurezas A e C do praziquantel. Com 30 dias de armazenamento, nenhum analito permaneceu estável.

Em relação às amostras armazenadas em temperatura ambiente, foi verificado que tanto a impureza C do febantel quanto o praziquantel e suas impurezas A e C degradaram consideravelmente após um dia de armazenamento ($p < 0,05$). Após sete dias somente a impureza B do praziquantel permaneceu estável ($p = 0,63$), sendo que nenhum analito permaneceu estável após 30 dias de armazenamento.

Em função dos resultados obtidos, sugere-se que as soluções de febantel, impureza C do febantel e das impurezas A e C do praziquantel sejam preparadas no momento de uso, enquanto que as demais sejam armazenadas sob refrigeração por um período máximo de sete dias.

TABELA 34 – RESULTADO DO ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES ESTOQUE A 4°C E A TEMPERATURA AMBIENTE (22 A 25°C) (Continua)

Análito	Concen. (ng.mL ⁻¹)	Período (dias)	Temperatura de 4°C			Temperatura ambiente (22 a 25°)		
			Área (média ± DP)	Área (%)	Teste t de Student (valor de p*)	Área (média ± DP)	Área (%)	Teste t de Student (valor de p*)
Febantel	50	0	2611666,7 ± 74139,5	100,0	1,00	2611666,7 ± 74139,5	100,0	1,00
		1	2570000,0 ± 60332,4	98,4	0,31	2538333,3 ± 90203,5	97,2	0,15
		7	2481666,7 ± 62423,3	95,0	8,21 x 10 ⁻³	2365000,0 ± 63796,6	90,6	1,04 x 10 ⁻⁴
		30	1073333,3 ± 25819,9	41,1	3,72 x 10 ⁻¹³	615166,7 ± 15766,0	23,5	1,95 x 10 ⁻¹⁴
Pamoato de pirantel	50	0	1856666,7 ± 57154,8	100,0	1,00	1856666,7 ± 57154,8	100,0	1,00
		1	1851666,7 ± 66156,4	99,7	0,89	1811666,7 ± 28577,4	97,6	0,11
		7	1803333,3 ± 32659,9	97,1	0,07	1700000,0 ± 16733,2	91,6	7,41 x 10 ⁻⁵
		30	843000,0 ± 22917,2	45,4	2,11 x 10 ⁻¹²	757166,7 ± 28244,8	40,8	1,33 x 10 ⁻¹²
Praziquantel	15	0	118166,7 ± 4665,5	100,0	1,00	118166,7 ± 4665,5	100,0	1,00
		1	115500,0 ± 4549,7	97,7	0,34	94416,7 ± 1910,4	79,9	4,22 x 10 ⁻⁷
		7	113666,7 ± 3983,3	96,2	0,10	93566,7 ± 4272,4	79,2	2,13 x 10 ⁻⁶
		30	32000,0 ± 1349,1	27,1	9,99 x 10 ⁻¹³	30633,3 ± 1264,4	25,9	8,15 x 10 ⁻¹³

TABELA 34 – RESULTADO DO ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES ESTOQUE A 4°C E A TEMPERATURA AMBIENTE (22 A 25°C) (Continuação)

Análito	Concen. (ng.mL ⁻¹)	Período (dias)	Temperatura de 4°C			Temperatura ambiente (22 a 25°)		
			Área (média ± DP)	Área (%)	Teste t de Student (valor de p*)	Área (média ± DP)	Área (%)	Teste t de Student (valor de p*)
Ivermectina	100	0	16683,3 ± 788,5	100,0	1,00	16683,3 ± 788,5	100,0	1,00
		1	16366,7 ± 694,7	98,1	0,48	16050,0 ± 544,1	96,2	0,14
		7	16316,7 ± 545,6	97,8	0,37	14491,7 ± 662,1	86,9	3,93 x 10 ⁻⁴
		30	10050,0 ± 392,5	60,2	4,72 x 10 ⁻⁹	7120,0 ± 157,7	42,7	5,30 x 10 ⁻¹¹
Impureza C do febantel	50	0	1898333,3 ± 46224,1	100,0	1,00	1898333,3 ± 46224,1	100,0	1,00
		1	1861666,7 ± 85654,3	98,1	0,38	1746666,7 ± 36697,0	92,0	8,97 x 10 ⁻⁵
		7	1806666,7 ± 58878,4	95,2	0,01	1705000,0 ± 37282,7	89,8	1,21 x 10 ⁻⁵
		30	793833,3 ± 21084,7	41,8	1,32 x 10 ⁻¹³	773333,3 ± 15983,3	40,7	7,52 x 10 ⁻¹⁴
Impureza A do praziquantel	30	0	183333,3 ± 8594,6	100,0	1,00	183333,3 ± 8594,6	100,0	1,00
		1	179000,0 ± 2966,5	97,6	0,27	141166,7 ± 3188,5	77,0	5,27 x 10 ⁻⁷
		7	155833,3 ± 5600,6	85,0	6,34 x 10 ⁻⁵	120333,3 ± 5316,6	65,6	2,95 x 10 ⁻⁸
		30	40300,0 ± 1720,5	22,0	2,30 x 10 ⁻¹²	35800,0 ± 678,2	19,5	1,43 x 10 ⁻¹²

TABELA 34 – RESULTADO DO ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES ESTOQUE A 4°C E A TEMPERATURA AMBIENTE (22 A 25°C) (Continuação)

Análito	Concen. (ng.mL ⁻¹)	Período (dias)	Temperatura de 4°C			Temperatura ambiente (22 a 25°)		
			Área (média ± DP)	Área (%)	Teste t de Student (valor de p*)	Área (média ± DP)	Área (%)	Teste t de Student (valor de p*)
Impureza B do praziquantel	30	0	166833,3 ± 5419,1	100,0	1,00	166833,3 ± 5419,1	100,0	1,00
		1	166500,0 ± 4888,8	99,8	0,91	165666,7 ± 3076,8	99,3	0,66
		7	163666,7 ± 3326,7	98,1	0,25	165166,7 ± 6337,7	99,0	0,63
		30	70033,3 ± 1806,3	42,0	1,58 x 10 ⁻¹²	30383,3 ± 1316,7	18,2	4,06 x 10 ⁻¹⁴
Impureza C do praziquantel	30	0	15083,3 ± 541,9	100,0	1,00	15083,3 ± 541,9	100,0	1,00
		1	14983,3 ± 655,5	99,3	0,78	12000,0 ± 456,1	79,6	8,80 x 10 ⁻⁷
		7	5593,3 ± 267,3	37,1	3,36 x 10 ⁻¹²	2686,7 ± 134,4	17,8	1,07 x 10 ⁻³
		30	Não realizado	-	-	Não realizado	-	-
Albendazol**	20	0	231666,7 ± 3266,0	100,0	1,00	231666,7 ± 3266,0	100,0	1,00
		1	228833,3 ± 8658,3	98,8	0,47	229166,7 ± 5419,1	98,9	0,35
		7	224666,7 ± 8140,4	97,0	0,08	221333,3 ± 6250,3	95,5	4,94 x 10 ⁻³
		30	107666,7 ± 4366,5	46,5	8,43 x 10 ⁻¹⁴	90866,7 ± 4481,8	39,2	2,81 x 10 ⁻¹⁴

TABELA 34 – RESULTADO DO ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES ESTOQUE A 4°C E A TEMPERATURA AMBIENTE (22 A 25°C) (Conclusão)

Analito	Concen. (ng.mL ⁻¹)	Período (dias)	Temperatura de 4°C			Temperatura ambiente (22 a 25°)		
			Área (média ± DP)	Área (%)	Teste t de Student (valor de p*)	Área (média ± DP)	Área (%)	Teste t de Student (valor de p*)
Eprinomectina**	50	0	54716,7 ± 2308,6	100,0	1,00	54716,7 ± 2308,6	100,0	1,00
		1	53083,3 ± 2279	97,0	0,24	53000,0 ± 2168,9	96,9	0,21
		7	52816,7 ± 2156,3	96,5	0,17	47633,3 ± 1367,7	87,0	7,20 x 10 ⁻⁵
		30	31716,7 ± 1351,2	58,0	1,29 x 10 ⁻⁹	27850,0 ± 1372,2	50,9	2,92 x 10 ⁻¹⁰

NOTA: * nível de confiança de 95%; ** padrão interno; n = 6

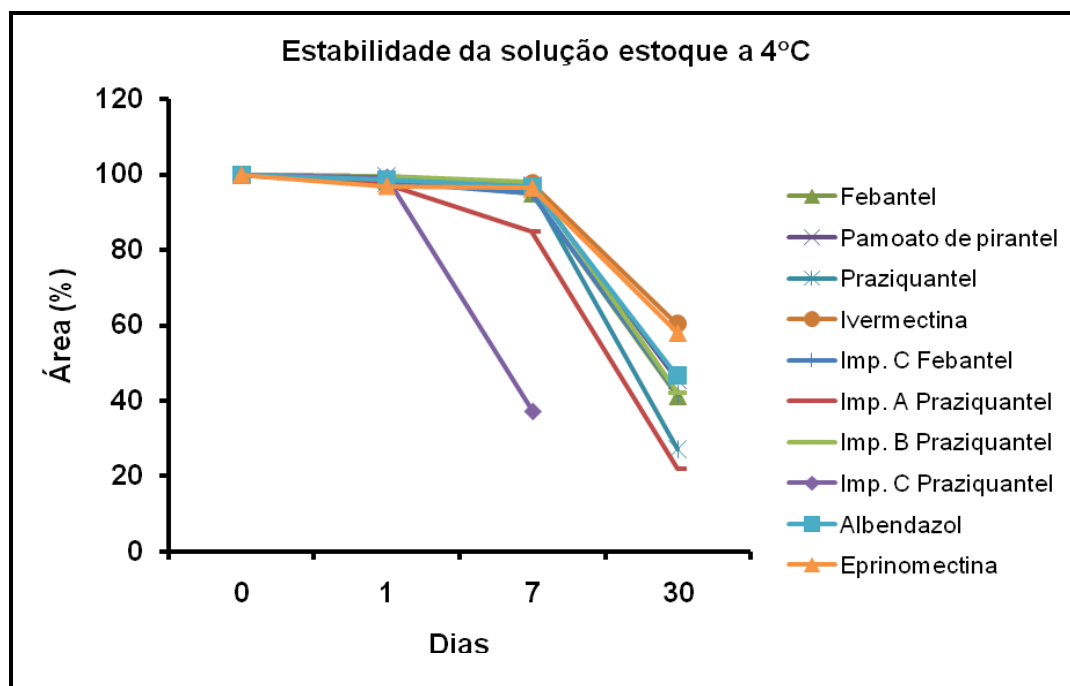


GRÁFICO 7 – ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES ESTOQUE EM REFRIGERADOR (4°C)

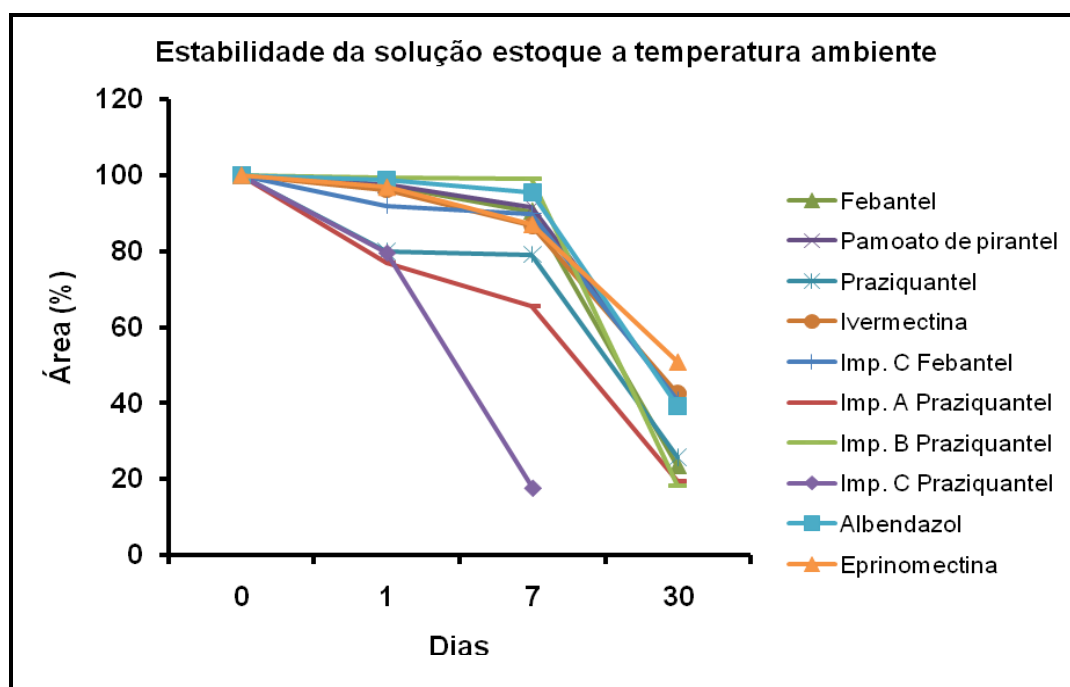


GRÁFICO 8 – ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES ESTOQUE A TEMPERATURA AMBIENTE

4.3.8.2 Estabilidade da solução de trabalho

A estabilidade da solução de trabalho foi avaliada comparando as áreas de cada composto obtidas de amostras recém-preparadas com aquelas obtidas após um período de 24 horas no gerenciador de amostras (20 °C). Nessa condição nenhum composto apresentou degradação ($p > 0,05$) e dessa forma podem ser determinados com segurança. Os resultados detalhados são apresentados na Tabela 35 e no Gráfico 9.

TABELA 35 – RESULTADO DO ESTUDO DE ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO DE TRABALHO APÓS ARMAZENAMENTO NO GERENCIADOR DE AMOSTRAS (20 °C)

Analito e concen. (ng.mL ⁻¹)	Período (horas)	Área (média ± DP)	Área (%)	Teste t de Student (valor de p*)
Febantel	50	0	2835000,0 ± 91815,0	100,0
	24	2831666,7 ± 57067,2	99,9	0,94
Pamoato de pirantel	50	0	1798333,3 ± 26394,4	100,0
	24	1778333,3 ± 24832,8	98,9	0,21
Praziquantel	15	0	140500,0 ± 4929,5	100,0
	24	135833,3 ± 3371,4	96,7	0,08
Ivermectina	100	0	18066,7 ± 725,7	100,0
	24	17433,3 ± 546,5	96,5	0,12
Impureza C do febantel	50	0	2025000,0 ± 80684,6	100,0
	24	2145000,0 ± 57532,6	97,3	0,17
Impureza A do praziquantel	30	0	196666,7 ± 4844,2	100,0
	24	195166,7 ± 9683,3	99,2	0,74
Impureza B do praziquantel	30	0	218166,7 ± 5600,6	100,0
	24	217000,0 ± 5176,9	99,5	0,71
Impureza C do praziquantel	30	0	15033,3 ± 605,5	100,0
	24	14360,0 ± 472,2	95,5	0,07
Albendazol**	20	0	230000,0 ± 6449,8	100,0
	24	228833,3 ± 5076,1	99,5	0,73
Eprinomectina**	50	0	48266,7 ± 1794,1	100,0
	24	48016,7 ± 2201,3	99,5	0,83

NOTA: * nível de confiança de 95%; ** padrão interno; n = 6

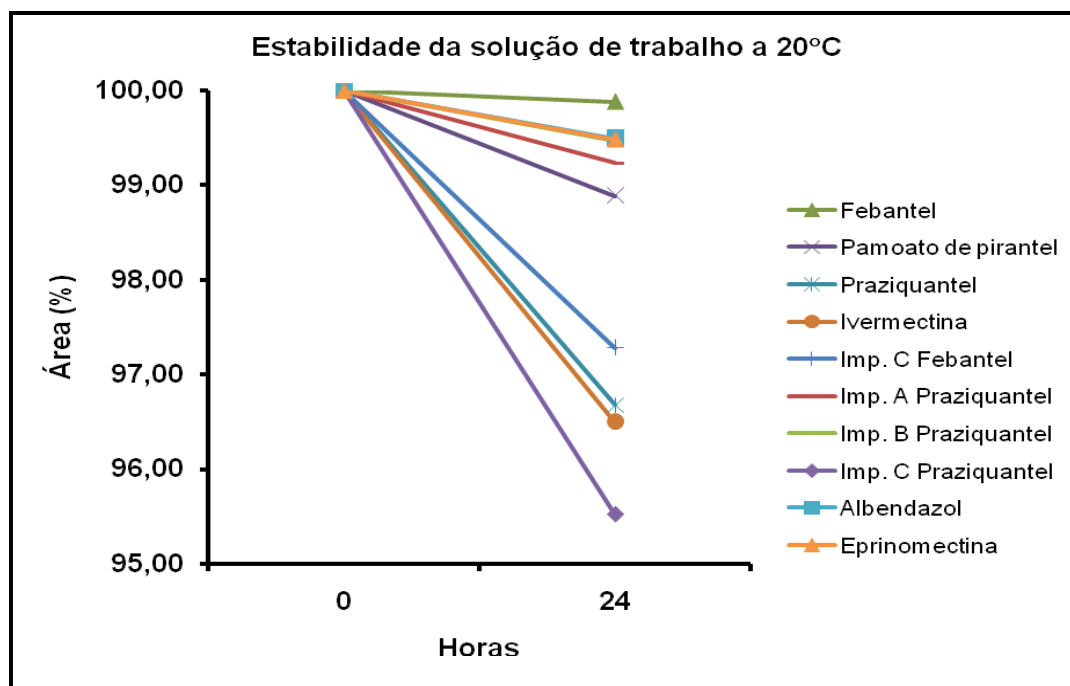


GRÁFICO 9 – ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO DE TRABALHO NO GERENCIADOR DE AMOSTRAS (20°C)

4.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DA IVERMECTINA

A análise de um medicamento normalmente envolve uma etapa simples de preparo de amostra, em que solventes ou mistura desses são utilizados para promover a extração dos fármacos da matriz. Eventualmente, pode ser necessária a inclusão de uma próxima etapa, com a finalidade de reduzir interferentes ou de concentrar um analito em específico.

O comprimido contendo a associação de antiparasitários (seção 3.1.1, pág. 68), objeto de estudo desse trabalho, contém 0,06 mg de ivermectina, 150 mg de febantel, 50 mg de praziquantel e 144 mg de pamoato de pirantel. É possível observar que a ivermectina se encontra em menor quantidade quando comparada aos demais fármacos, correspondendo a apenas 0,04% da quantidade de febantel.

Em paralelo existe a questão da ionização dos analitos, que é característica de cada substância, e que está diretamente relacionada com a intensidade de sinal. Assim, substâncias que ionizam menos proverão uma menor resposta no detector, e este também foi o caso da ivermectina.

Devido a baixa ionização da ivermectina e a sua grande diferença de concentração frente aos demais fármacos, esta teve de ser extraída separadamente. Nesse contexto, se fosse utilizada uma diluição direta para que o praziquantel, o febantel e o pamoato de pirantel fossem determinados dentro da faixa de detecção do espectrômetro de massas, a quantidade de ivermectina seria tão baixa que certamente essa substância não seria detectada.

Em virtude disso, foi necessário desenvolver um método de extração que permitisse isolar com certa seletividade a ivermectina dos demais fármacos. Para isso duas técnicas de extração foram avaliadas, a líquido-líquido e a em fase sólida.

4.4.1 Extração líquido-líquido

No desenvolvimento da extração líquido-líquido, quatro métodos foram testados os quais utilizaram solventes de diferentes polaridades.

No método 1, uma solução de trabalho contendo os quatro fármacos foi preparada em acetonitrila/metanol (50:50 v/v) e submetida à extração com hexano. A solução foi evaporada, redissolvida e diluída (1:1000 v/v), sendo verificado ao término do experimento que as intensidades de sinal do febantel, praziquantel e pamoato de pirantel permaneceram elevadas (acima de 2×10^6 cps). Isso demonstrou que a combinação acetonitrila/metanol 50:50 v/v e hexano não foi suficientemente seletiva para extrair a ivermectina.

Em uma segunda tentativa (método 2) a solução diluente foi substituída por ácido fórmico (88%, v/v)/metanol (10:90 v/v), mantendo o hexano como solvente extrator. Com essa modificação a intensidade de sinal do febantel, praziquantel e pamoato de pirantel reduziu consideravelmente (8×10^5 cps), entretanto não o suficiente para promover uma extração seletiva da ivermectina. O mesmo ocorreu para o método 3, em que foi utilizado como solução diluente a mistura de ácido fórmico (88%, v/v)/água e para o método 4, em que foi utilizado como solvente extrator o éter etílico, sendo dessa forma excluída a possibilidade do uso da extração líquido-líquido para o preparo das amostras.

4.4.2 Extração em fase sólida

Como a extração líquido-líquido não foi capaz de extrair com seletividade a ivermectina dos demais fármacos, optou-se pela extração em fase sólida (EFS). Os ensaios foram conduzidos com base em alguns artigos que já descrevem o uso dessa técnica para extração da ivermectina.

No trabalho descrito por Krogh e colaboradores (2008), foram avaliados os cartuchos Oasis MCX e Oasis HLB para extração de avermectinas em água. O uso do cartucho Oasis MCX se torna interessante pelo fato do sorbente desse cartucho ser de modo misto, ou seja, troca catiônica e fase reversa. Essa característica favorece a retenção de analitos com características básicas, caso do febantel e do pamoato de pirantel.

Os primeiros ensaios foram conduzidos em um cartucho Oasis MCX utilizando 1 mL de uma solução de trabalho preparada em ácido fórmico (88%, v/v)/metanol 5:95 v/v. Como solvente de lavagem foram utilizados acetona, metanol, acetonitrila e hidróxido de amônio (28%, p/p)/acetonitrila (5:95 v/v) sendo cada fração recolhida e analisada. Como resultado foi observado que tanto a ivermectina quanto o praziquantel eluíram junto com a solução diluente (ácido fórmico (88%, v/v)/metanol 5:95 v/v), ou seja, a retenção no sorbente foi mínima. Tendo em vista que nos comprimidos a concentração do praziquantel é muito maior do que a da ivermectina (50 mg em relação a 0,06 mg), se fossem realizadas as diluições necessárias para obter uma adequada faixa de quantificação para o praziquantel no espectrômetro de massas, a ivermectina não seria detectada. Portanto o cartucho Oasis MCX não pôde ser utilizado no preparo das amostras.

Em função dessa dificuldade, o cartucho Oasis HLB também foi avaliado. Esse cartucho apresenta um sorbente de fase reversa com balanço hidrófilo-lipófilo (copolímeros *N*-vinilpirrolidona e divinilbenzeno) de capacidade superior de adsorção de compostos hidrofóbicos, quando comparado com os cartuchos tradicionais de sílica-C18 (cerca de três vezes).

Os ensaios foram conduzidos utilizando uma solução de trabalho preparada em acetonitrila/água 25:75 v/v. A solução foi aplicada ao cartucho e o sorbente foi lavado sucessivamente com água ultrapura e diferentes proporções de acetonitrila/água. Cada fração foi recolhida e analisada em CLAE-EM/EM e ao

término dos ensaios foi observado que a maior parte dos fármacos de alta concentração (febantel, praziquantel e pamoato de pirantel) eluíram na primeira lavagem, junto com a solução diluente (acetonitrila/água 25:75 v/v). Portanto a ivermectina permaneceu retida no cartucho, e esse resultado foi considerado satisfatório.

De forma a melhorar ainda mais o *clean up* da amostra, o próximo passo foi otimizar o solvente de lavagem e a quantidade de vezes que este solvente deveria ser aplicado no cartucho (métodos 3, 4, 5 e 6, seção 3.5.2, pág. 86). Nessa etapa a recuperação da ivermectina também foi calculada comparando as áreas obtidas com uma sextuplicata de injeções de uma solução de trabalho (100 ng.mL^{-1}) com aquelas obtidas com os métodos testados, nas mesmas concentrações.

Como resultado foi observado que independentemente do método utilizado, existia a necessidade de lavar, no mínimo, vinte vezes o sorbente para reduzir ao máximo a quantidade dos fármacos de alta concentração. Nos métodos 3 e 5 foi observada uma boa recuperação da ivermectina ($>93\%$), entretanto, mesmo com vinte lavagens, a quantidade de febantel que permaneceu remanescente no sorbente era passível de saturar o detector.

Por sua vez, os métodos 4 e 6 (solução diluente e de lavagem acetonitrila:água 35:65 v/v e ácido fórmico (88%, v/v)/acetonitrila/água 10:35:55 v/v/v, respectivamente) foram efetivos para reduzir a quantidade de febantel, praziquantel e pamoato de pirantel das amostras. Desses, o método 4 foi o mais eficiente para remoção desses fármacos, e além de tudo foi o que promoveu a melhor recuperação da ivermectina (85,5%). Na Tabela 36 estão descritos os resultados do ensaio de recuperação obtidos com os métodos 3, 4, 5 e 6.

TABELA 36 – PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DA IVERMECTINA UTILIZANDO CARTUCHO OASIS HLB E DIFERENTES SOLVENTES DE LAVAGEM

Método	Média das áreas ^a ± DP	Média das áreas ^b ± DP	Recuperação (%)
3		15955,31 ± 199,66	95,54
4	16700,00 ± 126,74	14278,91 ± 101,57	85,50
5		15621,09 ± 65,62	93,54
6		11731,61 ± 39,82	70,25

NOTA: a: área obtida com solução de trabalho contendo 100 ng.mL^{-1} de ivermectina; b: área obtida da ivermectina após extração em fase sólida.

Em virtude dos bons resultados de recuperação da ivermectina obtida com o cartucho Oasis HLB, a próxima etapa foi avaliar a reprodutibilidade do método. Para isso um estudo foi conduzido com analistas diferentes e dias diferentes utilizando o método 4 (seção 3.5.2, pág. 86). As amostras foram preparadas em duplicata e para cada amostra três cartuchos foram utilizados. Como resultado, foi observado valores de recuperação próximos a 85% para os dois analistas, indicando que esse método de extração é reprodutível (Tabela 37).

TABELA 37 – VALORES DE RECUPERAÇÃO DA IVERMECTINA OBTIDOS ATRAVÉS DE ANALISTAS E DIAS DIFERENTES

Analista	Média ^a ± DP	Triplicata	Áreas ± DP	Média ^b ± DP	Recuperação (%)
1	20666,67 ± 981,50	1	17450,00 ± 636,40	17500,00 ± 70,71	84,68
		2	17550,00 ± 212,13		
2	19733,33 ± 635,09	1	16750,00 ± 353,55	16925,00 ± 247,49	85,77
		2	17100,00 ± 848,53		

NOTA: a: área obtida com solução de trabalho contendo 100 ng.mL⁻¹ de ivermectina; b: área obtida da ivermectina após extração em fase sólida pelo método 4.

4.5 DETERMINAÇÃO VIA CLAE-EM/EM DOS ANTIPARASITÁRIOS NAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE COMPRIMIDOS

Após o desenvolvimento e validação do método, os fármacos ivermectina, febantel, praziquantel e pamoato de pirantel foram quantificados nos comprimidos, considerando a especificação de teor de 90 a 110% da quantidade declarada.

O teor médio da ivermectina na amostra de uso humano é apresentado na Tabela 38 enquanto que os teores médios obtidos para os fármacos nas associações de uso veterinário são apresentados nas Tabelas 39, 40 e 41.

TABELA 38 – RESULTADO DA DETERMINAÇÃO DA IVERMECTINA NA AMOSTRA 1 (USO HUMANO)

Fármaco	Teor ^a (mg)	Faixa especificada* (mg)	Diluição direta		Extração em fase sólida	
			Teor encontrado (mg ± DP)	Teor (%)	Teor encontrado (mg ± DP)	Teor (%)
Ivermectina	6,00	5,40 – 6,60	6,185 ± 0,17	103,08	6,068 ± 0,21	101,13

NOTA: ^ateor declarado; *Faixa especificada de 90 a 110% em relação ao valor declarado (USP, 2008)

TABELA 39 – RESULTADO DA DETERMINAÇÃO DA IVERMECTINA, FEBANTEL, PRAZIQUANTEL E PAMOATO DE PIRANTEL NA AMOSTRA 2

Fármacos	Teor declarado (mg)	Faixa especificada* (mg)	Teor encontrado (mg ± DP)	Teor (%)
Ivermectina	0,06	0,054 – 0,066	0,091 ± 0,0035	151,67
Febantel	150	135 – 165	174,6 ± 1,67	116,40
Praziquantel	50	45 – 55	53,49 ± 1,13	106,98
Pamoato de pirantel	144	129,6 – 158,4	163,8 ± 4,67	113,75

NOTA: *Faixa especificada de 90 a 110% em relação ao valor declarado (USP, 2008)

TABELA 40 – RESULTADO DA DETERMINAÇÃO DA IVERMECTINA, FEBANTEL, PRAZIQUANTEL E PAMOATO DE PIRANTEL NA AMOSTRA 3

Fármacos	Teor declarado (mg)	Faixa especificada* (mg)	Teor encontrado (mg ± DP)	Teor (%)
Ivermectina	0,06	0,054 – 0,066	0,045 ± 0,0010	75,00
Febantel	150	135 – 165	151,2 ± 6,75	100,80
Praziquantel	50	45 – 55	46,59 ± 1,25	93,18
Pamoato de pirantel	144	129,6 – 158,4	140,5 ± 4,49	97,57

NOTA: *Faixa especificada de 90 a 110% em relação ao valor declarado (USP, 2008)

TABELA 41 – RESULTADO DA DETERMINAÇÃO DA IVERMECTINA, FEBANTEL, PRAZIQUANTEL E PAMOATO DE PIRANTEL NA AMOSTRA 4

Fármacos	Teor declarado (mg)	Faixa especificada* (mg)	Teor encontrado (mg \pm DP)	Teor (%)
Ivermectina	0,06	0,054 – 0,066	0,039 \pm 0,0010	65,00
Febantel	150	135 – 165	147,3 \pm 7,00	98,20
Praziquantel	50	45 – 55	45,79 \pm 0,35	91,58
Pamoato de pirantel	144	129,6 – 158,4	143,0 \pm 2,66	99,30

NOTA: *Faixa especificada de 90 a 110% em relação ao valor declarado (USP, 2008)

Como resultado foi observado que o teor da ivermectina na amostra 2 estava superior ao da faixa especificada (151,67%), enquanto que nas amostras 3 e 4 inferior ao preconizado (75 e 65%, respectivamente). Somente na amostra 1 (uso humano) o teor da ivermectina ficou dentro da faixa especificada. Além disso, foram obtidos teores similares para amostras preparadas por diluição direta e por extração em fase sólida, demonstrando mais uma vez que o método de extração desenvolvido é preciso.

Na amostra 2, tanto o teor do febantel quanto o do pamoato de pirantel ficou fora da faixa especificada (116,40 e 113,75%, respectivamente). Para essa amostra somente o praziquantel estava de acordo com o preconizado (106,98%). Com relação às amostras 3 e 4, o teor encontrado para o febantel, praziquantel e pamoato de pirantel estava dentro da faixa de 90 a 110%.

Em relação à ivermectina, os teores obtidos confirmam as discrepâncias na quantidade desse fármaco entre as amostras de uso veterinário, justificando mais uma vez a necessidade de um controle de qualidade mais rigoroso.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi obtido um método de quantificação por CLAE-EM/EM para determinação simultânea de ivermectina, febantel, praziquantel e pamoato de pirantel em comprimidos.

O método descrito na Farmacopéia Americana para a ivermectina emprega como técnica analítica CLAE-UV e é direcionado para amostras de uso humano, que apresentam maior concentração de ivermectina quando comparada às de uso veterinário. Os métodos propostos e disponíveis na literatura por CLAE-EM/EM são inviáveis para a análise da associação de antiparasitários em comprimidos, em virtude da ivermectina se apresentar em menor concentração quando comparada aos demais fármacos. Nesse contexto optou-se por associar a técnica CLAE-EM/EM, que apresenta alta sensibilidade e seletividade, com a extração em fase sólida, de modo a viabilizar a quantificação da ivermectina na presença dos outros fármacos.

Uma extração seletiva foi obtida com a utilização do cartucho Oasis HLB e solvente de limpeza acetonitrila:água (35:65 v/v), possibilitando uma recuperação de aproximadamente 85%.

Adequada ionização foi obtida para todos os analitos no modo positivo quando utilizado no diluente a combinação dos aditivos formiato de amônio e ácido fórmico (3 mmol.L⁻¹ e 0,1%, respectivamente).

O método desenvolvido provou ser adequado para a determinação da ivermectina, febantel, praziquantel e pamoato de pirantel nos comprimidos. Além disso, demonstrou seletividade, linearidade, precisão e exatidão aceitáveis de acordo com a legislação nacional e internacional vigente. As principais vantagens incluem a grande sensibilidade na detecção da ivermectina e a rapidez na análise das amostras, com uma corrida cromatográfica de 3,5 minutos.

O estudo de robustez indicou que todas as modificações propostas foram críticas para um ou outro analito e, em função disso, as condições do método não devem ser modificadas.

A maioria dos analitos em estudo apresentou boa estabilidade em solução estoque quando avaliados sete dias sob refrigeração, exceto o febantel, a impureza C do febantel e as impurezas A e C do praziquantel, que foram estáveis somente por

um dia. Em relação à solução de trabalho, todos os analitos foram estáveis por um período de 24 horas no gerenciador de amostras.

Quando doseados os fármacos nos comprimidos, foram verificados valores discrepantes no teor de ivermectina (65,00 a 151,67%) para as associações de antiparasitários. Estes resultados indicam a necessidade de um melhor controle de qualidade desses produtos, visto que baixas doses de ivermectina podem comprometer a sua eficácia enquanto que altas doses podem ser tóxicas para os animais.

Por fim, podemos afirmar que o método desenvolvido pode ser implementado com segurança na rotina do controle de qualidade da indústria veterinária, sendo uma alternativa para a análise dos comprimidos contendo a associação de ivermectina, febantel, praziquantel e pamoato de pirantel.

REFERÊNCIAS

- ALLENDER, W. J. High-performance liquid chromatographic determination of oxantel and pyrantel pamoate. **Journal of Chromatographic Science**, v. 26, n. 9, p.470-472, 1988.
- ALMEIDA, M. A. O.; AYRES, M. C. C. Agentes Anticestódeos e Antitrematódeos. In: SPINOSA, H. S., GÓRNIK, S. L. e BERNARDI, M. M. (Ed.). **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002a. p. 467-474.
- _____. Agentes Antinematódeos. In: SPINOSA, H. S., GÓRNIK, S. L. e BERNARDI, M. M. (Ed.). **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002b. p. 475-489.
- ANDRADE, S. F.; SANTARÉM, V. A. Endoparasitídeos e Ectoparasitídeos. In: ANDRADE, S. F. (Ed.). **Manual de Terapêutica Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 437-476.
- ANFALPET. ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS FABRICANTES DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO. **Mercado Pet 2010**. Disponível em: <<http://editorastilo.com.br/portal/pdf/indices/mercado-2010-4-petfood.pdf>>. Acesso em: 29/03/2011.
- ARAÚJO, F. R. *et al.* Larva migrans cutânea em crianças de uma escola em área do Centro-Oeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p.84-85, 2000.
- ARENA, J. P. *et al.* The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans*: correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding, and biological activity. **The Journal of Parasitology**, v. 81, n. 2, p.286-294, 1995.
- ARGEKAR, A. P.; RAJ, S. V.; KAPADIA, S. U. Simultaneous determination of mebendazole and pyrantel pamoate from tablets by high performance liquid chromatography-reverse phase (RP-HPLC). **Talanta**, v. 44, n. 11, p.1959-1965, 1997.
- BABIC, S. *et al.* Determination of multi-class pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 3, p.1185-1194, 2010.
- BALIS, G. Determination of benzimidazole residues using liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 727, n. 1-2, p.167-177, 1999.
- BARKER, J.; ANDO, D. J. **Mass spectrometry: analytical chemistry by open learning**. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 1999.

BARRAGRY, T. B. A review of the pharmacology and clinical uses of ivermectin. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 28, n. 8, p.512-517, 1987.

BEASLEY, C. A. *et al.* Identification of impurities in ivermectin bulk material by mass spectrometry and NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 4, p.1124-1134, 2006.

BIALECKA, W.; KULIK, A. Determination of active substances in multicomponent veterinary preparations of antiparasitic action by HPLC method. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 67, n. 5, p.463-468, 2010.

BONATO, P. S. *et al.* Simultaneous determination of albendazole metabolites, praziquantel and its metabolite in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 2, p.558-563, 2007.

BOWMAN, D. D.; ATKINS, C. E. Heartworm biology, treatment, and control. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, p.1127-1158, vii, 2009.

BOWMAN, D. D. *et al.* Hookworms of dogs and cats as agents of cutaneous larva migrans. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p.162-167, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto-lei n. 467, de 13 de fevereiro de 1969. Dispõe sobre a fiscalização de produtos de uso veterinário, dos estabelecimentos que os fabricam e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 fev. 1969. Disponível em:<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18516>>. Acesso em:11/05/2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 fev. 2003. Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 27/05/2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 13, de 03 de outubro de 2003. Aprova o Regulamento de Boas Práticas de Uso Veterinário e o Glossário. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 06 out. 2003. Disponível em:<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=3095>>. Acesso em:11/05/2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto n. 5053, de 22 de abril de 2004. Aprova o regulamento de fiscalização de produtos de uso veterinário e dos estabelecimentos que os fabriquem ou comerciem, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 abr. 2004. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7276>>. Acesso em: 11/05/2010.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ato n. 10, de 16 de setembro de 2005. Torna público o Roteiro para a Inspeção de Boas Práticas de Fabricação de Produtos Veterinários de Natureza Farmacêutica. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 13 out. 2005. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=13534>>. Acesso em: 11/05/2010.

BRASIL. Conselho Federal de Farmácia. Resolução n. 504, de 29 de maio de 2009. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 13 jul. 2009. Disponível em: <http://www.crfsp.org.br/joomla/index.php?option=com_content&view=article&id=1587%3Aresolucao-no-504-de-29-de-maio-de-2009-cff&catid=113%3Alegislacao&Itemid=202>. Acesso em: 01/05/2010.

BRITISH, Pharmacopoeia. ed. London: The Stationery Office, 2005.

BUDAVARI, S. **The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 12. ed. Whitehouse Station, NJ: Merck, 1996.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p.623-636, 2008.

CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama **Química Nova**, v. 24, n. 3, p.374-380, 2001.

CINTO, P. O. *et al.* LC Evaluation of Intestinal Transport of Praziquantel. **Chromatographia**, v. 69, n. Supplement 2, p.S213 - S217, 2009.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC**. 1. ed. São Paulo: Editora Blucher, 1998.

COLLINS, C. H. Princípios Básicos de Cromatografia. In: COLLINS, C. H., BRAGA, G. L. e BONATO, P. S. (Ed.). **Fundamentos de Cromatografia**. 1. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. p. 17-42.

CRIPPS, P. J. Veterinary education, zoonoses and public health: a personal perspective. **Acta Tropica**, v. 76, n. 1, p.77-80, 2000.

CROTTI, A. E. M. *et al.* Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p.287-292, 2006.

CROUBELS, S. *et al.* Determination of ivermectin B(1a) in animal plasma by liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 37, n. 8, p.840-847, 2002.

DE RUYCK, H. *et al.* Development and validation of a liquid chromatographic-electrospray tandem mass spectrometric multiresidue method for anthelmintics in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 976, n. 1-2, p.181-194, 2002.

DELATOUR, P.; TIBERGHIE, M. P.; BESSE, S. An HPLC procedure for the quantification of five metabolites of febantel in sheep serum. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 6, n. 3, p.233-5, 1983.

DOOLEY, K. C. Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. **Clinical Biochemistry**, v. 36, n. 6, p.471-481, 2003.

DURDEN, D. A. Positive and negative electrospray LC-MS-MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 850, n. 1-2, p.134-146, 2007.

DUSI, G.; GAMBA, V.; FAGGIONATO, E. Rapid determination of the antiparasitic drugs flubendazole and febantel in feeds by HPLC with ultraviolet detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 2, p.375-379, 2005.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 44, n. 3, p.210-230, 2009.

EPE, C. Intestinal nematodes: biology and control. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, p.1091-1107, vi-vii, 2009.

EUROPEAN, Pharmacopoeia. 6. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2007.

FASANMADE, A. A. *et al.* Bioequivalence of pyrantel pamoate dosage forms in healthy human subjects. **Biopharm Drug Dispos**, v. 15, n. 6, p.527-534, 1994.

FDA. Food and Drug Administration. **Animal Drugs @ FDA**. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/animaldrugsatfda/details.cfm?dn=133-953>>. Acesso em: 09/06/2010.

FORCIER, G. A.; MUSHINSKY, R. F.; WAGNER, R. L., JR. Spectrophotometric determination of pyrantel in pyrantel pamoate bulk samples and pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, n. 1, p.111-113, 1971.

FOREYT, W. J. **Parasitologia veterinária: manual de referência**. 5. ed. São Paulo: Roca, 2005.

GEARY, T. G. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p.530-532, 2005.

GHONEIM, M. M.; MABROUK, M. M.; TAWFIK, A. Direct determination of praziquantel in pharmaceutical formulations and human plasma by cathodic adsorptive stripping differential-pulse voltammetry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, n. 4, p.1311-1318, 2002.

GIANELLI, L. *et al.* Mass spectrometry of avermectins: structural determination of two new derivatives of Ivermectin B(1a). **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 14, n. 14, p.1260-1265, 2000.

GIL, E. S.; BATISTA FILHO, R. O. P. Validação de Processos. In: GIL, E. S. (Ed.). **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007. p. 47-52.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p.140-150, 2003.

GONZALEZ CANGA, A. *et al.* The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p.25-37, 2009.

GUIMARÃES, A. M. *et al.* Ovos de *Toxocara* sp. e larvas de *Ancylostoma* sp. em praça pública de Lavras, MG. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 2, p.293-295, 2005.

HANPITAKPONG, W. *et al.* A high-performance liquid chromatographic method for determination of praziquantel in plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 4, p.871-876, 2004.

HERNANDO, M. D. *et al.* Fast separation liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the confirmation and quantitative analysis of avermectin residues in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1155, n. 1, p.62-73, 2007.

HEUKELBACH, J.; FELDMEIER, H. Epidemiological and clinical characteristics of hookworm-related cutaneous larva migrans. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p.302-309, 2008.

ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology - Q2 (R1). Disponível em: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>. Acesso em: 20/05/2010.

INMETRO. **DQO–CGCRE–008: orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos.** Disponível

em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf> Acesso em: 16/09/2011.

INOUE, K. *et al.* Simultaneous determination of avermectins in bovine tissues by LC-MS/MS. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 21, p.3596-3602, 2009.

JABOR, V. A.; ROCHA, G. M.; BONATO, P. S. Enantioselective analysis of praziquantel in plasma samples. **Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications**, v. 696, n. 2, p.307-311, 1997.

JAIN, R.; JADON, N.; RADHAPYARI, K. Determination of antihelminthic drug pyrantel pamoate in bulk and pharmaceutical formulations using electro-analytical methods. **Talanta**, v. 70, n. 2, p.383-6, 2006.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: COLLINS, C. H., BRAGA, G. L. e BONATO, P. S. (Ed.). **Fundamentos de Cromatografia**. 1. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. p. 273-397.

JENKE, D. R. Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. Part II. Guidelines for Primary Validation Parameters. . **Instrumentation Science and Technology**, v. 26, n. 1, p.1-35, 1998.

KINSELLA, B. *et al.* New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Chimica Acta**, v. 637, n. 1-2, p.196-207, 2009.

KORFMACHER, W. A. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 20, p.1357-1367, 2005.

KROGH, K. A. *et al.* Development of an analytical method to determine avermectins in water, sediments and soils using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1211, n. 1-2, p.60-69, 2008.

LANDUYT, J. *et al.* A high performance liquid chromatographic method for the determination of febantel and its major metabolites in lamb plasma. **Biomedical Chromatography**, v. 7, n. 2, p.78-81, 1993.

LEHNER, A. F. *et al.* ESI+ MS/MS confirmation of canine ivermectin toxicity. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 44, n. 1, p.111-119, 2009.

LI, J. *et al.* A high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy-based analysis of commercially available praziquantel tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 2, p.263-267, 2007.

LIMA, R. M. *et al.* Enantioselective analysis of praziquantel and trans-4-hydroxypraziquantel in human plasma by chiral LC-MS/MS: Application to pharmacokinetics. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 27, p.3083-3088, 2009.

LIU, J.; STEWART, J. T. High-performance liquid chromatography determination of praziquantel enantiomers in human serum using a reversed-phase cellulose-based chiral stationary phase and disc solid-phase extraction. **Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications**, v. 692, n. 1, p.141-147, 1997.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p.1559-1568, 2010.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 01, p.214-222, 2009.

MARTINEZ VIDAL, J. L. *et al.* Development of fast screening methods for the analysis of veterinary drug residues in milk by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 7, p.2777-2790, 2010.

MARTINS JÚNIOR, H. A. *et al.* Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em "tandem" (CLAE-EM/EM). **Química Nova**, v. 29, n. 3, p.586-592, 2006.

MEHLHORN, H. *et al.* A light and electron microscopic study on the synergistic effect of pyrantel and the febantel metabolite febendazole on adult *Toxocara canis* in vitro. **Parasitology Research**, v. 90, n. 4, p.305-313, 2003.

MENDHAM, J. *et al.* **Vogel: análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

MONTOYA, A. *et al.* Efficacy of Drontal Flavour Plus (50 mg praziquantel, 144 mg pyrantel embonate, 150 mg febantel per tablet) against *Giardia* sp in naturally infected dogs. **Parasitology Research**, v. 103, n. 5, p.1141-4, 2008.

MONTOYA-ALONSO, J. A. *et al.* Canine dirofilariosis caused by *Dirofilaria immitis* is a risk factor for the human population on the island of Gran Canaria, Canary Islands, Spain. **Parasitology Research**, v. 107, n. 5, p.1265-1269, 2010.

MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p.556-563, 2003.

MORAES, R. G.; LEITE, I. C.; GOULART, E. G. **Parasitologia e Micologia Humana**. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 2000.

MOROVJAN, G. *et al.* Determination of fenbendazole, praziquantel and pyrantel pamoate in dog plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 797, n. 1-2, p.237-244, 1998.

NOLAN, T. J. *et al.* Efficacy of an ivermectin/pyrantel pamoate chewable formulation against the canine hookworms, *Uncinaria stenocephala* and *Ancylostoma caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 41, n. 1-2, p.121-125, 1992.

PEREIRA, A. S. *et al.* Desafios da química analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 28, n., p.S107-S111, 2005.

REINEMEYER, C. R.; COURTNEY, C. H. Drogas Antinematóides. In: ADAMS, H. R. (Ed.). **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003a. p. 791 - 818.

_____. Fármacos Anticestóides e Antitrematóides. In: ADAMS, H. R. (Ed.). **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003b. p. 819 - 828.

REY, L. **Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem e nos Trópicos Ocidentais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 0, p.1-10, 2004.

RIDTITID, W. *et al.* LC determination of praziquantel in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, n. 1, p.181-186, 2002.

ROBERTSON, I. D. *et al.* The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v., n. 30, p.1369-1377, 2000.

RSC. **Keeping it together.** Disponível em:
<<http://www.rsc.org/chemistryworld/Issues/2003/February/together.asp>
> Acesso em:23/11/2011.

SABBATINI, J. Z. Progress on the development and single-laboratory validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of carbadox and pyrantel tartrate in type B and C medicated feeds. **Journal of AOAC International**, v. 92, n. 1, p.26-33, 2009.

SANTARÉM, V. A. *et al.* Toxocaríase canina e humana. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 3, p.437 - 447, 2009.

SHOOP, W. L. *et al.* Efficacy of an ivermectin and pyrantel pamoate combination against adult hookworm, *Ancylostoma braziliense*, in dogs. **Australian Veterinary Journal**, v. 73, n. 3, p.84-85, 1996.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SU, S. *et al.* Simultaneous determination of febantel, fenbendazole, oxfendazole and oxfendazole sulfone in livestock by matrix solid dispersion extraction technique and HPLC. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 12, n. 3, p.244-253, 2004.

TAWEETHAVONSAWAT, P. *et al.* Efficacy of a combination product containing pyrantel, febantel and praziquantel (Drontal Plus Flavour, Bayer Animal Health) against experimental infection with the hookworm *Ancylostoma ceylanicum* in dogs. **Parasitology Research**, v. 106, n. 2, p.533-7, 2010.

TEIXEIRA, M. A. *et al.* Prevalence of *Toxocara canis* infection in public squares of the Concórdia City, Santa Catarina, Brazil. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 63, n., p.69 - 71, 2008.

THORPE, V. A. A collaborative study: high-pressure liquid chromatographic determination of carbadox and pyrantel tartrate in animal feeds. **Journal of Chromatographic Science**, v. 26, n. 11, p.545-550, 1988.

USC. **Catálogo de experimentos.** Disponível em:<<http://www.usc.es/gl/investigacion/riaidt/espectrometria/experimentos.html>> Acesso em:23/11/2011.

USP. **The United States Pharmacopoeia**. 31. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008.

VESSMAN, J. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, n. 8-10, p.867-869, 1996.

WHELAN, M. *et al.* Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with rapid polarity switching. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 27, p.4612-4622, 2010.

YAMADA, R. *et al.* Simultaneous determination of residual veterinary drugs in bovine, porcine, and chicken muscle using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, n. 1, p.54-65, 2006.

YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 88, n., p.4451-4459, 1984.